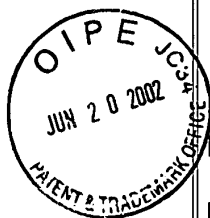


PATENT
Customer No. 22,852
Attorney Docket No. 03806.0533



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Mailliet, *et al.*

Serial No.: 10/040,370

Filed: January 9, 2002

For: Chemical Derivatives and Their
Application as Antitelomerase
Agents

)
)
) Group Art Unit: 1614
)
) Examiner: To Be Assigned
)
)
)
)
)
)
)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

CLAIM FOR PRIORITY

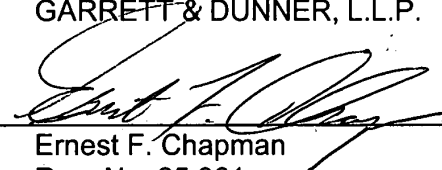
Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of French Patent Application No. 01 00205, filed January 9, 2001, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: June 20, 2002

By: 
Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961

FINNEGAN
HENDERSON
FARABOW
GARRETT &
DUNNER LLP

1300 I Street, NW
Washington, DC 20005
202.408.4000
Fax 202.408.4400
www.finnegan.com

EFC/FPD/peg
Enclosures

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **26 DEC. 2001**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets**Martine PLANCHE**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLESIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

9 JAN 2001 Réservé à l'INPI REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 0100205 - 9 JAN. 2001		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AVENTIS PHARMA S.A. Direction Brevets 20 avenue Raymond Aron 92165 ANTONY CEDEX	
Vos références pour ce dossier (facultatif) ST 01001			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT ANTITELOMERASE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PHARMA S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		Société anonyme	
N° SIREN		3 0 4 4 6 3 2 8 4	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01 55 71 71 71	
N° de téléc. pie (facultatif)		01 47 02 50 14	
Adresse électronique (facultatif)		www.aventis.com	



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

9 JAN 2001 Réservé à l'INPI REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT 0100205 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DB 540 W / 250899	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		ST 01001	
6 MANDATAIRE			
Nom		LE PENNEC	
Prénom		Magali	
Cabinet ou Société		AVENTIS PHARMA S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		8850	
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92165	ANTONY CEDEX
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 55 71 71 57	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 55 71 72 91	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		magali.le-pennec@aventis.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Antony, le 9 janvier 2001		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Aventis Pharma S.A. Fondé de Pouvoir </div> Magali LE PENNEC	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT
ANTITELOMERASE

La présente invention est relative à la thérapie du cancer et concerne de nouveaux agents anticancéreux ayant un mécanisme d'action bien particulier. Elle concerne aussi de nouveaux composés chimiques ainsi que leur application thérapeutique chez l'homme.

La présente invention concerne l'utilisation de nouveaux composés chimiques non nucléotidiques qui interagissent avec des structures spécifiques de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces nouveaux composés sont constitués d'un agent répartiteur lié à un groupe aminoaromatique. Ces nouveaux composés sont utiles dans le traitement des cancers et agissent en particulier en tant qu'agents inhibiteurs de la télomérase. Ils sont particulièrement utiles pour stabiliser l'ADN en structure G-quadruplexe (tétrades de guanines). L'application thérapeutique de l'inhibition de la télomérase via la stabilisation de ces G-quadruplexes est l'arrêt de la mitose cellulaire et la mort des cellules à division rapide telles que les cellules cancéreuses et éventuellement l'induction de la sénescence des cellules cancéreuses.

Les composés de la présente invention présentent l'avantage du point de vue thérapeutique de bloquer la télomérase. Du point de vue biologique, la télomérase permet l'ajout de séquences d'ADN répétées du type T T A G G G, dites séquences télomériques, à l'extrémité du télomère, lors de la division cellulaire. Par cette action la télomérase rend la cellule immortelle. En effet, en l'absence de cette activité enzymatique, la cellule perd à chaque division 100 à 150 bases, ce qui la rend rapidement sénescence. Lors de l'apparition de cellules cancéreuses à division rapide, il est apparu que ces cellules présentaient des télomères maintenus à une longueur stable au cours de la division cellulaire. Dans ces cellules cancéreuses il est apparu que la télomérase était fortement activée et qu'elle permettait l'addition de motifs répétés de séquences télomériques à la fin du télomère et permettait donc la conservation de la longueur du télomère dans les cellules cancéreuses. Il est apparu depuis quelques temps que plus de 85 % des cellules cancéreuses présentaient des tests positifs à la présence

de télomérase alors que les cellules somatiques ne présentent pas cette caractéristique.

5 Ainsi la télomérase est une cible très convoitée pour traiter les cellules cancéreuses. La première approche évidente pour bloquer la télomérase a été l'utilisation de structures nucléotidiques (Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(7), 2635-2639). Parmi les composés non nucléotidiques qui ont été utilisés dans l'art antérieur on peut citer les diaminoanthraquinones (Sun et al. J. Med. Chem. 40(14), 2113-6) ou les diethyloxadicarbocyanines (Wheelhouse R. T. Et al. J. Am. Chem. Soc. 10 1998(120) 3261-2).

Le brevet WO 99/40087 décrit l'utilisation de composés qui interagissent avec les structures G-quadruplexes qui sont des composés pérylènes et des carbocyanines contenant au moins sept cycles dont deux hétérocycles.

15 Il est apparu de façon tout-à-fait surprenante que des structures simples permettaient d'obtenir un résultat au moins équivalent avec des structures beaucoup moins compliquées du point de vue chimique. Les composés de la présente invention qui répondent à l'objectif visé c'est-à-dire qui fixent la structure G-quadruplex et par ce fait présentent une activité 20 inhibitrice des télomérases répondent à la formule générale suivante :

cycle aromatique azoté - NR_3 - répartiteur - NR'_3 - chaîne hydrocarbonée non aromatique

dans laquelle

• le cycle aromatique azoté, représente :

25

o une quinoléine éventuellement substituée par au moins

o un groupe $\text{N}(\text{Ra})(\text{Rb})$ dans lequel Ra et Rb, identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

30

o un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment

o une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

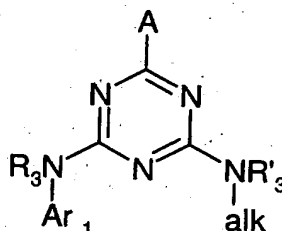
- une benzamidine ou
 - une pyridine
 - R³ et R'³, identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un radical alkyle en C¹-C⁴
 - le répartiteur représente :
 - ◇ un groupe triazine éventuellement substitué par un radical alkyle ayant 1 à 4 atomes de carbone, un radical thio, oxy ou amino eux mêmes éventuellement substitués par une ou plusieurs chaînes alkyle à chaîne courte contenant 1 à 4 atomes de carbone ou encore un atome d'halogène ou
 - ◇ un groupe carbonyle ou
 - ◇ un groupe C(=NH)-NH-C(=NH) ou
 - ◇ un groupe alkylédiyle contenant 3 à 7 atomes de carbone ou
 - ◇ un groupe diazine éventuellement substitué par les mêmes groupes que la triazine
 - ou un de ses sels.
- On entend au sens de la formule ci-dessus par chaîne hydrocarbonée non aromatique une chaîne alkyle (C¹-C⁴), alkényle (C²-C⁴), linéaire ou ramifiée, cycloalkyle (C³-C¹⁸), cycloalkényle (C³-C¹⁸), hétérocycloalkyle (C³-C¹⁸). Le groupe hétérocycloalkyle inclut éventuellement l'atome d'azote.
- Il est évidemment entendu que la chaîne hydrocarbonée non aromatique peut être éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle, alkylaminocarbonyle et/ou

arylamino-carbonyl, dialkylamino-carbonyl, alkyl-carbonyl ou aryl-carbonyl, cyano et trifluorométhyle.

Les chaînes alkyle des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent de préférence 1 à 4 atomes de carbone et les groupes ayles des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent de préférence 5 à 18 atomes de carbone.

On préfère parmi l'ensemble des composés ci-dessus inclus utiliser ceux comportant comme répartiteur un groupe triazine ou diazine. Parmi les groupes diazines on préfère utiliser les pyrimidines ou les quinazolines. Parmi les chaînes hydrocarbonées on préfère les chaînes alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone, les chaînes hétérocycloalkyles ou cycloalkyles contenant 4 à 7 atomes de carbone.

Parmi les triazines on préfère les composés répondant à la formule (I) ci-dessous :



dans laquelle :

- A représente

- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou

- un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 a la même signification que précédemment ou

- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou ou un groupe trifluorométhyle ou

- un atome d'hydrogène ou

- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode

- R3 et R'3, identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4.

- Ar₁ représente :

• le cycle aromatique azoté, représente :

- 5 o une quinoléine éventuellement substituée par au moins
 - o un groupe N(Ra)(Rb) dans lequel Ra et Rb, identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou
 - 10 o un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment
 - o une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou
 - o une benzamidine ou
 - 15 o une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4

- alk représente

- 20 o un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino
- o un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino
- 25 o un motif hétérocyclyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

ou un de ses sels.

Il est évident que les motifs quinoléines peuvent être substitués par tout autre groupe n'intervenant pas dans l'application visée, ainsi des groupes acridines ou isoquinoléines ou quinazolines ou quinoxalines ou

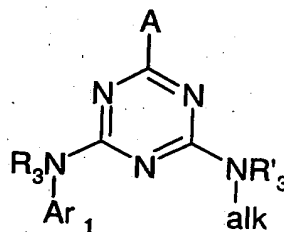
phtalazines ou benzothiazines ou benzoxazines ou phénoxazines ou phénothiazines sont inclus dans la définition des groupes quinoléines.

On préfère parmi les composés de formule (I) ci-dessus ceux qui comportent un hétérocycle choisi parmi les groupes 4-aminoquinolyl, 4-alkyl-
5 ou 4-dialkylamino-quinolyl, 4-aminoquinolinium ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

En ce qui concerne les groupes A, ils représentent de préférence le radical méthylthio, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4 atomes de carbone.

10 En ce qui concerne la chaîne hydrocarbonée non aromatique, elle représente de préférence une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent de préférence 1 à 4 atomes de carbone, encore plus préférentiellement 1 à 2 atomes de
15 carbone et les groupes aryle contiennent de préférence 5 à 18 atomes de carbone, encore plus préférentiellement 6 atomes de carbone.

Un autre objet de la présente invention concerne les composés de formule (I) en tant que produits chimiques nouveaux. Il concerne donc les produits nouveaux répondant à la formule (I) suivante :



20 dans laquelle :

- A représente

• un groupe amino de formule NR₁R₂ dans lequel R₁ et R₂ identiques ou différents représentent un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou

25 • un groupe OR₁ ou SR₁ dans lequel R₁ représente l'hydrogène ou a la même signification que précédemment ou

- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe trifluorométhyle ou
 - un atome d'hydrogène ou
 - un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode
- 5
- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C1-C4
- Ar_1 représente :
- le cycle aromatique azoté, représente :
- 10
- une quinoléine éventuellement substituée par au moins
 - un groupe $N(R_a)(R_b)$ dans lequel R_a et R_b , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou
 - un groupe OR_a dans lequel R_a est défini comme précédemment
- 15
- une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou
 - une benzamidine ou
 - une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec
- 20
- un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4
- alk représente
- un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, ou diarylamino
- 25
- un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino
- 30
- un motif hétérocyclyle contenant de 5 à 7 atomes de carbone

ou un de ses sels.

Les composés de formule (I) qui sont préférés sont ceux pour lesquels Ar_1 représente un groupe choisi parmi les motifs suivants : 4-amino- ou 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino-quinolyl ou quinolynium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

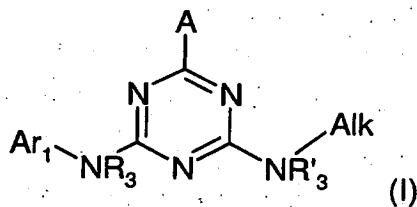
Les composés de formule générale (I) qui sont préférés sont ceux pour lesquels A représente un groupe amino ou diméthylamino ou plus préférentiellement méthylthio.

Les composés de formule générale (I) qui sont préférés sont ceux pour lesquels la chaîne hydrocarbonée non aromatique représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone, notamment 1 à 2 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone, notamment 6 atomes de carbone.

On préfère tout particulièrement les composés de formule générale (I) pour lesquels la chaîne hydrocarbonée non aromatique représente une chaîne 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl telle que la chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl

Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation des composés de la formule (I) comme produit pharmaceutique à usage humain.

Les procédés de préparation des composés de formule (I)



sont décrits ci-après.

Dans le cas où Ar_1 et Alk sont présents, la triazine de formule générale (A) peut être obtenue par déplacement séquentiel des atomes d'halogène, très généralement des atomes de chlore, des produits de formule générale (B) par les amines Ar_1 puis Alk de formule générale (C) selon le

schéma 1 :

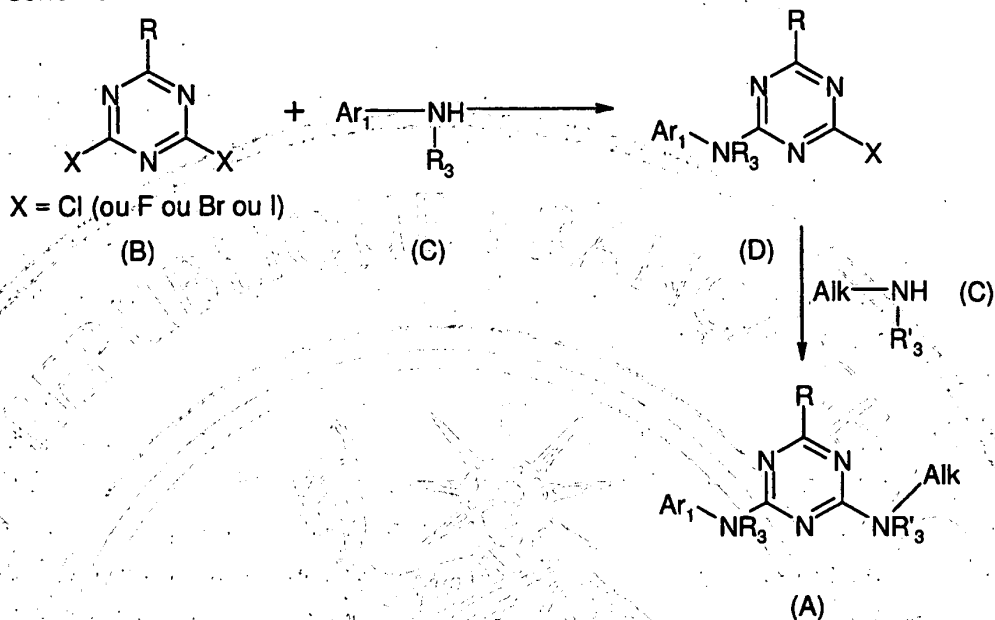


Schéma 1

Généralement on opère avec 1 mole de dihalogéno-s-triazine, ou trihalogéno-s-triazine, et 1 mole d'amine Ar_1 . On préfère opérer dans un solvant inerte tel que l'acétone éventuellement aqueux ou un alcool éventuellement aqueux, comme l'éthanol, ou un solvant halogéné, tel que le dichlorométhane, ou un éther tel que l'oxyde de diéthyle ou le dioxane, ou un solvant aprotique polaire tel que le DMF le DMSO ou la NMP. Selon une meilleure manière de mettre en oeuvre l'invention on opère à une température comprise entre 20°C et 50°C. Ensuite on ajoute 1 mole d'amine Alk au produit de formule générale (D), qui peut être éventuellement isolé. On opère notamment à une température comprise entre 50°C et le reflux.

Avantageusement, on peut opérer dans les conditions décrites dans J. Fluor. Chem., 1988, 39(1), 117-123.

Méthode générale 2

Selon une seconde méthode les produits de formule générale (A) dans lesquels Ar sont définis tels que précédemment et R représente un groupe NR_1R_2 ou OR_1 ou SR_1 peuvent être également préparés par déplacement nucléophile d'un atome d'halogène, généralement un atome de

chlore, d'un produit de formule générale (A) dans lequel R représente un atome d'halogène selon le schéma 2 :

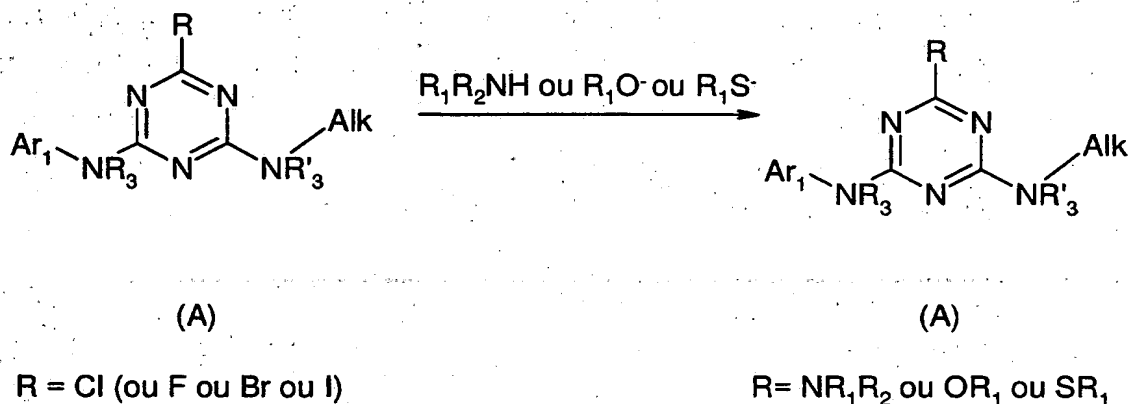


Schéma 2

- 5 On opère généralement en condensant 1 mole de produit de formule générale (A) dans lequel R représente un atome d'halogène, préférentiellement un atome de chlore, avec 1 mole d'amine $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$ ou d'alcoolate R_1O^- ou de thioalcoolate R_1S^- . La réaction a lieu en milieu inerte dans les conditions de la réaction. On peut citer parmi les solvants inertes
- 10 l'acétone éventuellement aqueux ou un alcool éventuellement aqueux comme l'éthanol, ou un solvant halogéné tel que le dichlorométhane, ou un éther tel que l'oxyde de diéthyle ou le dioxane, ou un solvant aprotique polaire tel que le DMF le DMSO ou la NMP. Lorsque le groupe entrant représente un groupe $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$, on opère de préférence à une température
- 15 comprise entre 20°C et le reflux, en présence notamment d'une base organique, telle que la triéthylamine, ou minérale, telle que la soude ou le carbonate de sodium ou de potassium. Il est également possible de ne pas utiliser de base lors de la réaction d'amination, et d'isoler un chlorhydrate du produit de formule générale (A), dont la base peut ensuite être libérée.
- 20 Lorsque le groupe entrant représente un groupe R_1O^- ou R_1S^- on opère préférentiellement avec un alcoolate ou un thioalcoolate alcalin ou alcalinoterreux, tel qu'un sel de sodium ou de potassium ou de lithium ou d'ammonium ou de césium ou de baryum, dans un solvant aprotique polaire tel que le DMF ou le DMSO ou la NMP, à une température comprise entre
- 25 50°C et le reflux.

Méthode générale 3

Selon un troisième procédé de préparation les composés pour lesquels R représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle, droit ou ramifié contenant de 1 à 4 atomes de carbone, peuvent également être préparés par condensation d'un bisguanide de formule générale (E), avec un dérivé d'acide, préférentiellement un chlorure d'acide ou un ester de méthyle de formule générale (F) selon le schéma 3 :

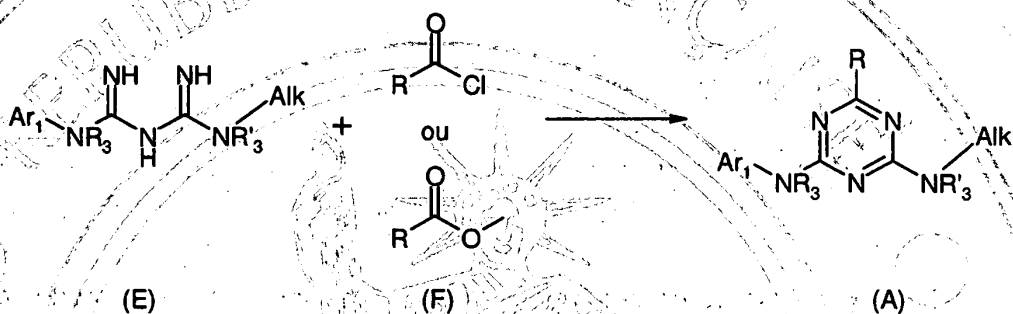


Schéma 3

La condensation entre le bisguanide de formule générale (E) et le dérivé d'acide de formule générale (F) est effectuée généralement dans un alcool comme le méthanol ou l'éthanol. On préfère opérer à une température comprise entre 0°C et la température de reflux.

Les bisguanides de formule générale (E) symétriques ou dissymétriques peuvent être obtenus en opérant dans les conditions décrites dans la littérature et en particulier selon le brevet J.P. 94-4993.

Méthode générale 4

Il est entendu que les s-triazines de formule générale peuvent être obtenues sous forme de bibliothèques, en appliquant les méthodes décrites dans les schémas 1, 2, 3, 4 ou 5 en chimie parallèle et/ou combinatoire en phase liquide ou en phase solide, étant entendu que, lorsqu'on travaille en phase solide, l'un quelconque des réactifs est préalablement fixé sur un support solide, choisi en fonction de la réaction chimique mise en jeu, et que ladite réaction chimique est suivie d'une opération de clivage du produit de la réaction du support solide.

La présente invention concerne aussi les compositions thérapeutiques contenant un composé selon l'invention, en association avec un support pharmaceutiquement acceptable selon le mode d'administration choisi. La composition pharmaceutique peut se présenter sous forme solide, liquide ou de liposomes.

Parmi les compositions solides on peut citer les poudres, les gélules, les comprimés. Parmi les formes orales on peut aussi inclure les formes solides protégées vis-à-vis du milieu acide de l'estomac. Les supports utilisés pour les formes solides sont constitués notamment de supports minéraux comme les phosphates, les carbonates ou de supports organiques comme le lactose, les celluloses, l'amidon ou les polymères. Les formes liquides sont constituées de solutions de suspensions ou de dispersions. Elles contiennent comme support dispersif soit l'eau, soit un solvant organique (éthanol, NMP ou autres) ou de mélanges d'agents tensioactifs et de solvants ou d'agents complexants et de solvants.

La dose administrée des composés de l'invention sera adaptée par le praticien en fonction de la voie d'administration du patient et de l'état de ce dernier.

Les composés de la présente invention peuvent être administrés seuls ou en mélange avec d'autres anticancéreux. Parmi les associations possibles on peut citer

- les agents alkylants et notamment le cyclophosphamide, le melphalan, l'ifosfamide, le chlorambucil, le busulfan, le thiotepa, la prednimustine, la carmustine, la lomustine, la semustine, la steptozotocine, la decarbazine, la témozolomide, la procarbazine et l'hexaméthylmélamine

- les dérivés du platine comme notamment le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine

- les agents antibiotiques comme notamment la bléomycine, la mitomycine, la dactinomycine,

- les agents antimicrotubules comme notamment la vinblastine, la vincristine, la vindésine, la vinorelbine, les taxoides (paclitaxel et docétaxel).

les anthracyclines comme notamment la doxorubicine, la daunorubicine, l'idarubicine, l'épirubicine, la mitoxantrone, la losoxantrone

5 • les topoisomérases des groupes I et II telles que l'étoposide, le teniposide, l'amsacrine, l'irinotecan, le topotecan et le tomudex,

• les fluoropyrimidines telles que le 5-fluorouracile, l'UFT, la floxuridine,

10 • les analogues de cytidine telles que la 5-azacytidine, la cytarabine, la gemcitabine, la 6-mercaptopurine, la 6-thioguanine

• les analogues d'adénosine telles que la pentostatine, la cytarabine ou le phosphate de fludarabine

• le methotrexate et l'acide folinique

15 • les enzymes et composés divers tels que la L-asparaginase, l'hydroxyurée, l'acide trans-rétinoïque, la suramine, la dexrazoxane, l'amifostine, l'herceptin ainsi que les hormones oestrogéniques, androgéniques.

20 Il est également possible d'associer aux composés de la présente invention un traitement par les radiations. Ces traitements peuvent être administrés simultanément, séparément, séquentiellement. Le traitement sera adapté au malade à traiter par le praticien.

L'activité de stabilisation des G-quadruplexes peut être déterminée par une méthode utilisant la formation d'un complexe avec la fluoresceine dont le protocole expérimental est décrit ci-après.

25 Oligonucléotides

Tous les oligonucléotides, modifiés ou non, ont été synthétisés par Eurogentec SA, Seraing, Belgique. L'oligonucléotide FAM + DABCYL porte la référence catalogue, OL-0371-0802. Il possède la séquence: GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG correspondant à 3.5 répétitions du motif
30 télomérique humain (brin riche en G). La fluoresceine est attachée à l'extrémité 5', le DABCYL à l'extrémité 3', par les bras chimiques décrit par Eurogentec. La concentration des échantillons est vérifiée par

spectrophotométrie, en enregistrant le spectre d'absorbance entre 220 et 700 nm et en utilisant le coefficient d'extinction molaire fourni par le fournisseur.

Tampons

- 5 Toutes les expériences ont été réalisées dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7.6 contenant 0.1 M de Chlorure de Lithium (ou de Chlorure de Sodium). L'absence de contamination fluorescente dans le tampon a été préalablement vérifiée. L'oligonucléotide fluorescent est ajouté à la concentration finale de 0.2 μ M.

10 Etude de Fluorescence

- Toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un appareil Spex Fluorolog DM1B, en utilisant une largeur de raie d'excitation de 1.8 nm et une largeur de raie d'émission de 4.5 nm. Les échantillons sont placés dans une cuvette en quartz micro de 0.2 x 1 cm. La température de l'échantillon est contrôlée par un bain-marie extérieur. L'oligonucléotide seul a été analysé à 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80°C. Les spectres d'émission sont enregistrés en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 470 nm. Les spectres d'excitation sont enregistrés en utilisant soit 515 nm soit 588 nm comme longueur d'onde d'émission. Les spectres sont corrigés de la réponse de l'instrument par des courbes de référence. Une extinction importante (80-90 %) de la fluorescence de la fluoresceine à température ambiante est observée, en accord avec un repli intramoléculaire de l'oligonucléotide à 20°C sous forme d'un G-quadruplex, ce qui induit une juxtaposition de ses extrémités 5' et 3', respectivement liées à la fluoresceine et au DABCYL.
- 25 Cette juxtaposition entraîne un phénomène déjà décrit d'extinction de fluorescence, utilisé pour les "Molecular Beacons".

T_m en fluorescence :

- Une solution stock d'oligonucléotide à la concentration en brin de 0.2 μ M dans un tampon 0.1 M LiCl 10 mM cacodylate pH 7.6 est préalablement préparée, chauffée brièvement à 90°C et refroidie lentement à 20°C, puis distribuée par aliquots de 600 μ l dans les cuves de fluorescence. 3 μ l d'eau (pour le contrôle) ou 3 μ l du produit à tester (stock à 200 μ M,
- 30

concentration finale 1 μ M) sont alors ajoutés et mélangés. Les échantillons sont alors laissés à incuber pendant au moins 1 heure à 20°C avant chaque mesure. L'utilisation de temps d'incubation plus longs (jusqu'à 24 heures) n'a pas d'influence sur le résultat obtenu.

- 5 Chaque expérience ne permet que la mesure d'un seul échantillon. Celui-ci est d'abord incubé à une température initiale de 20°C, porté à 80°C en 38 minutes, laissé 5 minutes à 80°C, puis refroidi à 20°C en 62 minutes. Durant ce temps, la fluorescence est mesurée simultanément à deux longueurs d'onde d'émission (515 nm et 588 nm) en utilisant 470 nm comme
- 10 longueur d'onde d'excitation. Une mesure est effectuée toutes les 30 secondes. La température du bain-marie est enregistrée en parallèle, et le profil de fluorescence en fonction de la température est reconstitué à partir de ces valeurs. Les profils de fluorescence sont ensuite normalisés entre 20°C et 80°C, et la température pour laquelle l'intensité d'émission à 515 nm
- 15 est la moyenne de celles à haute et basse température est appelée T_m . Dans ces conditions, le T_m de l'échantillon de référence sans addition de produit est de 44°C dans un tampon Chlorure de Lithium. Cette température est portée à plus de 55°C dans un tampon Chlorure de Sodium. L'addition d'un composé stabilisant le G-quadruplex induit une augmentation du T_m .
- 20 Cette augmentation est jugée significative si elle est supérieure à 3°.

L'activité biologique antitélomérase est déterminée par le protocole expérimental suivant :

Préparation de l'extrait enrichi en activité télomérase humaine

- 25 La lignée de leucémie HL60 est obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville USA). Les cellules sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI 1640 contenant, L-Glutamine à 2 mM, Penicilline 200 U/ml, streptomycine 200 μ g/ml, gentamycine 50 μ g/ml et additionné de 10 % de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur.

- 30 Une aliquote de 10^5 cellules est centrifugée à 3000xG et le surnageant écarté. Le culot de cellules est resuspendu par plusieurs pipettages successifs dans 200 μ l de tampon de lyse contenant CHAPS 0.5 %, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, $MgCl_2$ 1mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoethanol 5 mM, PMSF 0.1 mM et glycérol 10 % et est conservé dans la glace pendant

30 minutes. Le lysat est centrifugé à 16 000xG pendant 20 minutes à 4°C et 160 µl du surnageant est récupéré. Le dosage des protéines de l'extrait est effectué par la méthode de Bradford. L'extrait est conservé à -80°C.

Dosage de l'activité télomérase

- 5 L'inhibition de l'activité télomérase est déterminée par un protocole d'extension de l'oligonucléotide TS (⁵AATCGTTCGAGCAGAGTT³), en présence d'un extrait cellulaire enrichi en activité télomérase et des composés qui sont ajoutés à différentes concentrations (10, 1, 0.1 et 0,01 µg/ml). La réaction d'extension est suivie d'une amplification PCR des
- 10 produits d'extension à l'aide des oligonucléotides TS et CXext (⁵GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA³).

Le milieu réactionnel est préparé selon la composition suivante :

	Tris HCl pH 8,3	20 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
15	Tween 20	0,005 % (P/V)
	EGTA	1 mM
	dATP	50 µM
	dGTP	50 µM
	dCTP	50 µM
20	dTTP	50 µM
	Oligonucléotide TS	2 µg/ml
	Oligonucléotide CXext	2 µg/ml
	Sérum Albumine bovine	0,1 mg/ml
	Taq DNA polymérase	1 U/ml
25	alpha 32P dCTP (3000 Ci/mme)	0.5 µl
	Extrait télomérase	200 ng sous un volume de 10 µl
	Produit à tester ou solvant	sous un volume de 5 µl
	Eau bi-distillée QS	50 µl

Les oligonucléotides sont obtenus auprès d'Eurogentec (Belgique) et sont conservés à -20°C à une concentration stock de 1 mg/ml dans de l'eau distillée.

5 Les échantillons réactionnels sont assemblés dans des tubes à PCR de 0.2 ml et une goutte d'huile de paraffine est déposée sur chacune des réactions de l'expérience avant la fermeture des tubes.

Les échantillons réactionnels sont ensuite incubés dans un appareil à PCR de type Cetus 4800 selon les conditions de températures suivantes :

10 15 minutes à 30°C,
1 minute à 90°C,
suivis de 30 cycles de,
30 secondes à 94°C,
30 secondes à 50°C,
et 1 minute 30 secondes à 72°C,
15 suivis d'un cycle final de 2 minutes à 72°C.

Pour chacun des échantillons, une aliquote de 10 µl est pipetée sous la couche d'huile et mélangée avec 5 µl d'un tampon de dépôt contenant :

20	TBE	3X
	glycérol	32 % (P/V)
	Bleu de bromophénol	0.03 %
	Xylène cyanol	0.03 %

Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide 12 % dans un tampon TBE 1X pendant 1 heure sous une tension de 200 volts, à l'aide d'un système d'électrophorèse Novex.

25 Les gels d'acrylamides sont ensuite séchés sur une feuille de papier whatmann 3MM à 80°C pendant 1 heure.

L'analyse et la quantification des produits de la réaction sont effectuées à l'aide d'un appareil InstantImager (Pacard).

Pour chaque concentration de composé testée, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la réaction et calculés à partir du contrôle enzymatique non traité et de l'échantillon sans enzyme (blanc) selon la formule suivante :

5
$$\left(\frac{\text{Valeur Composé} - \text{valeur blanc}}{\text{Valeur contrôle enzymatique} - \text{valeur blanc}} \right) \times 100.$$

La concentration de composé induisant une inhibition de 50 % de la réaction télomérase (IC50) est déterminée à l'aide d'une représentation graphique semi logarithmique des valeurs d'inhibition obtenues en fonction de chacune des concentrations de composé testée.

On considère qu'un composé est actif en tant qu'agent antitélomérase lorsque la quantité inhibant 50 % de la réaction télomérase est notamment inférieure à 5 μM .

15 L'activité biologique cytotoxique sur des lignées de tumeur humaines est déterminée selon le protocole expérimental suivant :

Les lignées de cellules humaines KB et A549 sont originaires de l'ATCC (Americam Type Culture Collection, Rockville USA). Les cellules A549 sont cultivées en couche en flacon de culture dans du milieu RPMI 1640, L-Glutamine à 2 mM, Penicilline 200 U/ml, streptomycine 200 $\mu\text{g/ml}$ et additionné de 10 % de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur. Les cellules KB sont cultivées en couche en flacon de culture dans du milieu de Dulbelco's contenant, L-Glutamine à 2 mM, Penicilline 200 U/ml, streptomycine 200 $\mu\text{g/ml}$ et additionné de 10 % de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur.

25 Les cellules en phase exponentielles de croissances sont trypsinées, lavées dans du PBS 1X et sontensemencées en microplaques 96 puits (Costar) à raison de 4×10^4 cellules/ml pour A549 et de $1,5 \times 10^4$ cellules/ml (0.2 ml/puit) puis incubées pendant 96 heures en présence de concentrations variables de produit à étudier (10, 1, 0.1 et 0.01 $\mu\text{g/ml}$, chaque point en quadruplicata). 16 heures avant la fin de l'incubation, 0.02 % final de rouge neutre est ajouté dans chaque puits. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées par du PBS 1X et lysées par 1 % de lauryl sulfate de sodium. 30 L'incorporation cellulaire du colorant, qui reflète la croissance cellulaire, est

évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm pour chaque échantillon à l'aide d'un appareil de lecture Dynatech MR5000.

Pour chaque concentration de composé testé, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de croissance cellulaire et calculés à partir du contrôle non traité et du milieu de culture sans cellules (blanc) selon la formule suivante :

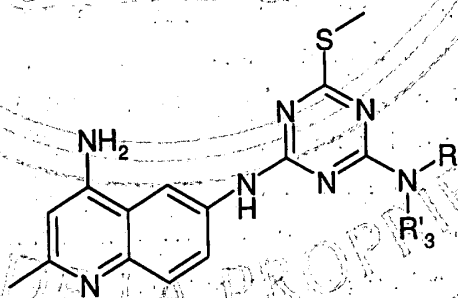
$$\left(\frac{\text{Valeur Composé} - \text{valeur blanc}}{\text{Valeur contrôle cellules} - \text{valeur blanc}} \right) \times 100$$

La concentration de composé induisant une inhibition de 50 % de la croissance (IC50) est déterminée à l'aide d'une représentation graphique semi logarithmique des valeurs d'inhibition obtenues en fonction de chacune des concentrations de composé testée.

On considère qu'un composé est actif comme agent cytotoxique si la concentration inhibitrice de 50 % de la croissance des cellules tumorales testées est notamment inférieure à 10 μM .

Les exemples suivants et non limitatifs sont donnés pour illustrer l'invention.

Exemple 1 : Synthèse en parallèle de dérivés substitués de N6-[6-amino-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine



Préparation de la N6-(6-chloro-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine

Dans un tricol de 1 litre, à une solution de 5 g (25 mmoles) de 2,6-dichloro-6-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazine, qui peut être préparée selon J. Amer. Chem.

Soc., 1945, 67, 662, dans 400 ml de tétrahydrofurane, on ajoute successivement 4,4 g (25 mmoles) de 2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, qui peut être préparée selon J. Med. Chem. 1992, 35, 252, et 2,8 g (25 mmoles) de carbonate de sodium. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 16 heures. Après évaporation du tétrahydrofurane, le résidu est repris par 400 ml d'un mélange d'eau et de dichlorométhane (50-50 en volumes). La phase organique est décantée, séchée sur sulfate de sodium et concentrée à sec sous pression réduite. On obtient alors 7,5 g (88 %) de N6-(6-chloro-4-méthylsulfanyl-triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, sous forme d'un solide jaune pâle dont les caractéristiques sont les suivantes :

- point de fusion = 294°C
- spectre de RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}-d_6$, δ en ppm) : 2,43 (s : 3H) ; 2,52 (s : 3H) ; 6,47 (s : 1H) ; 6,61 (mf : 2H) ; 7,62 (d large, $J = 9 \text{ Hz}$: 1H) ; 7,69 (d, $J = 9 \text{ Hz}$: 1H) ; 8,32 (mf : 1H) ; 10,80 (mf : 1H).

15 Synthèse en parallèle de N6-[6-(2-diméthylamino-éthylamino)-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine (exemple 1-1)

Dans un réacteur magnétique chauffant avec condenseur Zymark, de type STEM RS2050 contenant 25 puits en parallèle munis chacun d'un tube en verre de 50 ml, on introduit 50 mg (0,15 mmole) de N6-(6-amino-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthylquinoline-4,6-diamine. Dans le premier tube (exemple 1-1), on ajoute successivement 5 ml de dioxane, 16 mg (0,15 mmole) de carbonate de sodium, 23 mg (0,15 mmole) d'iodure de sodium et 27 mg (0,3 mmole) de 2-diméthylamino-éthylamine. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux sous argon pendant 24 heures. Après refroidissement, le contenu du tube est évaporé sous pression réduite, repris par 5 ml d'eau et 5 ml d'acétate d'éthyle et filtré. La phase organique est décantée, séchée et concentrée sous pression réduite. Le produit brut obtenu est alors purifié par LC/MS en utilisant une colonne de silice C18 Waters Xterra 3.5 μM , de diamètre 3 mm et de longueur 50 mm, en éluant par un gradient linéaire d'élution constitué au temps initial ($t_0 = 0 \text{ mn}$) par de l'eau contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique et au temps final ($t_f = 4 \text{ mn}$) par de l'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique. On obtient ainsi, après purification, 58 mg de trifluoroacétate de N6-[(6-(méthyl-quinolin-



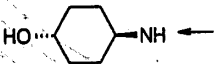
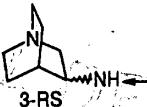
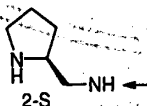
6-yl-amino)-4-méthylthio-triazin-2-yl]-quinaldine-4,6-diamine, dont les caractéristiques sont les suivantes :

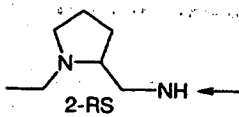
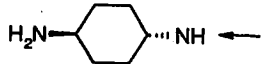
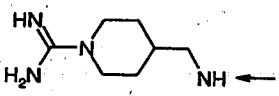
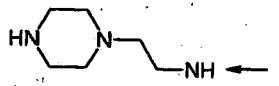
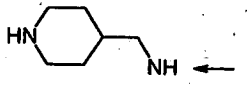
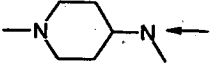
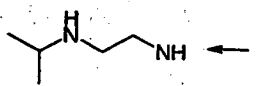
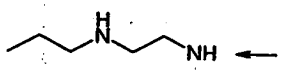
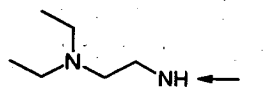
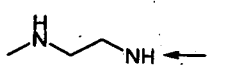
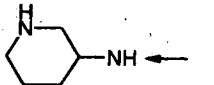
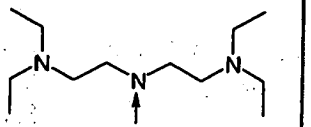
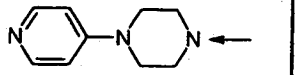
- spectre de masse (DAD-TIC) = 454 (MH⁺)

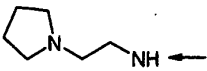
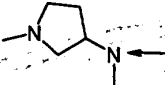
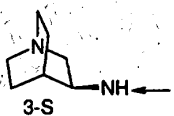
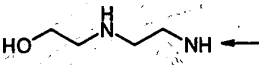
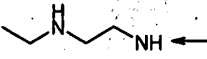
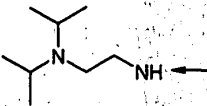
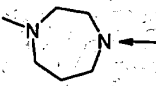
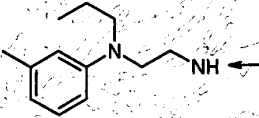
- temps de rétention = 2,69 mn (les temps de rétention sont obtenus sur

- 5 Colonne hypersil C18 5 µm 50 mm diamètre 4.6 mm marque Purity Elite en éluant avec un mélange de solvants A (H₂O/TFA 0.05 %) et B (ACN/TFA 0.05 %) avec un gradient linéaire allant de 95 % A/5 % B (t = 0 mn) à 10 % A/90 % B à t = 3,5 mn puis palier 2 mn).

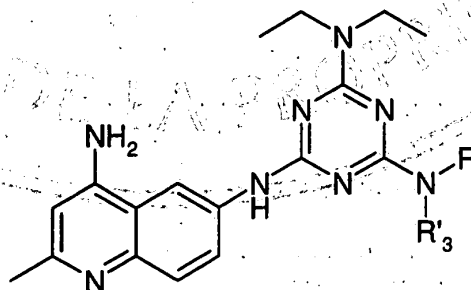
- 10 Les exemples 1-1 à 1-26 ont été obtenus en opérant comme ci-dessus dans un réacteur Zymark STEM RS2050. Les structures, les diverses conditions opératoires utilisées et les caractéristiques des exemples 1-1 à 1-26 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Exemple	Structure	Conditions réactionnelles			Caractéristiques	
		Solvant	Chauffage	Nbre de mmoles d'amine	Masse MH ⁺	Temps de Rétention (mn)
1-1		dioxane	17 h./100°	0,3	384	2,69
1-2		dioxane	17 h./100°	0,3	410	2,91
1-3	 racémique trans	dioxane	17 h./100°	0,15	411	2,86
1-4	 3-RS	dioxane	3 j./100°	0,45	422	2,85
1-5	 2-S	dioxane	17 h./100°	0,15	396	2,84

1-6		dioxane	17 h./100°	0,15	424	2,79
1-7	 racémique trans	dioxane	17 h./100°	0,15	410	2,72
1-8		dioxane	2 j./100°	0,3	452	2,81
1-9		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	425	2,43
1-10		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	410	2,51
1-11		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	424	2,50
1-12		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	398	2,46
1-13		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	398	2,48
1-14		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	412	2,47
1-15		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	384	2,48
1-16		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	396	2,49
1-17		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	511	2,38
1-18		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	459	2,62

1-19		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	410	2,44
1-20		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	410	2,52
1-21		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	422	2,55
1-22		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	400	2,36
1-23		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	384	2,40
1-24		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	440	2,58
1-25		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	410	2,48
1-26		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	474	2,86

Exemple 2 : Synthèse en parallèle de dérivés substitués de N6-[6-amino-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine



Préparation de la N6-(6-chloro-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine

5 Dans un tricol de 1 litre, à une solution de 5 g (22,5 mmoles) de 2,6-dichloro-4-diéthylamino-[1,3,5]triazine commerciale dans 300 ml de tétrahydrofurane, on ajoute successivement 3,91 g (22,5 mmoles) de 2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, qui peut être préparée selon J. Med. Chem. 1992, 35, 252, et 2,4 g (22,5 mmoles) de carbonate de sodium. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 20 heures. Après évaporation du tétrahydrofurane, le résidu est repris par 400 ml d'un mélange d'eau et de dichlorométhane (50-50 en volumes). La phase organique est décantée, séchée sur sulfate de sodium et concentrée à sec sous pression réduite. On obtient alors 7,4 g (92 %) de N6-(6-chloro-4-diéthylamino-triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, sous forme d'un solide jaune dont les caractéristiques sont les suivantes :

- 10 - point de fusion = 120°C
- 15 - spectre de RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d_6 , δ en ppm) : 1,14 (mt : 6H) ; 2,42 (s : 3H) ; de 3,50 à 3,70 (mt : 4H) ; 6,47 (s et mf : 3H en totalité) ; 7,54 (d large, $J = 9$ Hz : 1H) ; 7,67(dd, $J = 9$ et 2 Hz : 1H) ; 8,27 (mf : 1H) ; 10,09 (mf : 1H).

20 Synthèse en parallèle de N6-[(6-(3-diméthylamino-propylamino)-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine
(exemple 2-1)

25 Dans un réacteur magnétique chauffant avec condenseur Zymark, de type STEM RS2050 contenant 25 puits en parallèle munis chacun d'un tube en verre de 50 ml, on introduit 50 mg (0,13 mmole) de N6-(6-chloro-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine. Dans le premier tube (exemple 2-1), on ajoute successivement 5 ml de DMF, 19 mg (0,14 mmole) de carbonate de potassium, 21 mg (0,14 mmole) d'iodure de sodium et 14 mg (0,14 mmole) de 3-diméthylamino-propylamine. Le milieu réactionnel est chauffé à 120°C sous argon pendant 16 heures. Après refroidissement, le contenu du tube est évaporé sous pression réduite, repris par 5 ml d'eau, filtré et lavé avec de l'oxyde de diéthyle. Le produit brut obtenu est alors purifié par LC/MS en utilisant une colonne de silice C18 Waters Xterra 3.5 μM , de diamètre 3 mm et de longueur 50 mm, en éluant

30

par un gradient linéaire d'élution constitué au temps initial ($t_0 = 0$ mn) par de l'eau contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique et au temps final ($t_f = 4$ mn) par de l'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique. On obtient ainsi, après purification, 12 mg de N6-[(6-(3-diméthylamino-propylamino)-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de masse (DAD-TIC) = 423 (MH^+)
- temps de rétention = 0,79 mn (les temps de rétention sont obtenus sur Colonne hypersil C18 5 μm 50 mm diamètre 4.6 mm marque Purity Elite en éluant avec un mélange de solvants A (H_2O/TFA 0.05 %) et B (ACN/TFA 0.05 %) avec un gradient linéaire allant de 95 % A/5 % B ($t = 0$ mn) à 10 % A/90 % B à $t = 3,5$ mn puis palier 2 mn).

Les exemples 2-1 à 2-2 ont été obtenus en opérant comme ci-dessus dans un réacteur Zymark STEM RS2050. Les structures, les diverses conditions opératoires utilisées et les caractéristiques des exemples 2-1 et 2-2 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

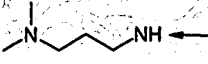
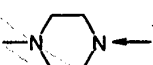
Exemple	Structure	Conditions réactionnelles			Caractéristiques	
		Solvant	Chauffage	Nbre de mmoles d'amine	Masse MH^+	Temps de Rétention (mn)
2-1		DMF	16 h./120°	0,14	423	0,79
2-2		DMF	16 h./120°	0,14	421	0,79

Tableau de résultats biologiques

Exemple	TRAP télomérase IC50 μ M	G-4 ΔT_m $^{\circ}$ C	Cytotoxicité A549 IC50 μ M
1-1	0,79	6	
1-2	0,5	5.6	7.5
1-3	4,4	3.1	
1-4	0,1	5.6	
1-5	1,6	2.8	
1-6	1,36		
1-7	0,47		
1-8	0,98		8.5
1-9	1,64	7	
1-10	0,94	7	
1-11	1,1	4.5	
1-12	3,1		
1-13	2,9		
1-14	3,2		
1-15	4,6		
1-16	1,29		
1-17	1,6		
1-19	1		
1-20	3,1		
1-21	0,7		
1-22	3,2		
1-23	3,8		
1-24	3,9		
1-25	1,5		10
1-26	0,86	33	< 0.3
2-1	0,90	7.9	
2-2	5,4	2.4	

REVENDECATIONS

1.- Composés fixant la structure G-quadruplex des télomères caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale suivante :

5 cycle aromatique azoté - NR_3 - répartiteur - NR'_3 - chaîne hydrocarbonée non aromatique

dans laquelle

- le cycle aromatique azoté, représente :

- une quinoléine éventuellement substituée par au moins

- un groupe $\text{N}(\text{Ra})(\text{Rb})$ dans lequel Ra et Rb, identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

- un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment

- une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

- une benzamidine ou

- une pyridine

- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4

- le répartiteur représente :

- ◇ un groupe triazine éventuellement substitué par un radical alkyle ayant 1 à 4 atomes de carbone, un radical thio, oxy ou amino eux même éventuellement substitués par un ou plusieurs chaînes alkyle à chaîne courte contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un atome d'halogène ou

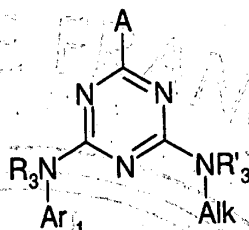
- ◇ un groupe carbonyle ou

- ◇ un groupe $\text{C}(=\text{NH})\text{-NH-C}(=\text{NH})$ ou

- ◇ un groupe alkyllediyle contenant 3 à 7 atomes de carbone ou
 - ◇ un groupe diazine éventuellement substitué par les mêmes groupes que la triazine
- 5 ou un de ses sels.
- 2 - Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que le répartiteur est choisi parmi les groupes triazine ou diazine.
- 3 - Composés selon la revendication 2 caractérisés en ce que les groupes diazines sont des pyrimidines ou des quinazolines.
- 10 4 - Composés selon l'une des revendications précédentes caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est choisie parmi les chaîne alkyle (C1-C4), alkényle (C2-C4), linéaires ou ramifiées, cycloalkyle (C3-C18), cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18) incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR'3.
- 15 5 - Composés selon la revendication 4 caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, 20 guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle ; alkylaminocarbonyle et/ou arylaminocarbonyle, dialkylaminocarbonyle, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.
- 25 6 - Composés selon la revendication 5 caractérisés en ce que les chaînes alkyle des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryles des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent 5 à 18 atomes de carbone.
- 30 7 - Composés selon la revendication 4 caractérisés en ce que parmi les chaînes hydrocarbonées on préfère les chaînes alkyle contenant 2 à 3

atomes de carbone, les chaînes hétérocycloalkyles ou cycloalkyles contenant 5 à 7 atomes de carbone.

8 - Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule (I) ci-dessous :



dans laquelle :

- A représente

- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou
- un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 a la même signification que précédemment ou
- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe trifluorométhyle ou
- un atome d'hydrogène ou
- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode

- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un groupe alkyle en C1-C4

- Ar_1 représente

- le cycle aromatique azoté, représente
 - une quinoléine éventuellement substituée par au moins
 - un groupe $N(R_a)(R_b)$ dans lequel R_a et R_b , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

○ un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment

○ une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

5

○ une benzamidine ou

○ une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4

10

- alk représente une chaîne hydrocarbonée, éventuellement substituée, non aromatique choisie parmi les chaîne alkyle (C1-C4), alkényle (C2-C4), linéaires ou ramifiées, cycloalkyle (C3-C18), cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18) incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR³

ou un de ses sels.

15

9 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, 20 guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle; alkylaminocarbonyle et/ou arylaminocarbonyle, dialkylaminocarbonyle, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.

25

10 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que Ar₁ représente un groupe choisi parmi les groupes suivants: 4-amino- ou 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino- quinolyl ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

30

11 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que les groupes A représentent le radical thiométhyl, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4 atomes de carbone.

12 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que A représente un groupe méthylthio.

13 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino, ou un motif hétérocyclyle ou cycloalkyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

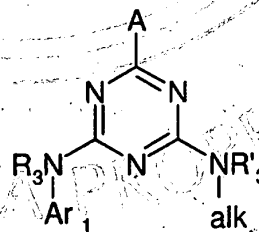
14 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone.

15 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl.

16 - Composés de la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils ont une activité inhibitrice des télomérases.

17 - Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisés en ce qu'ils ont une activité anticancéreuse.

18 - Composés nouveaux répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- A représente

12 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que A représente un groupe méthylthio.

13 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino, ou un motif hétérocyclyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

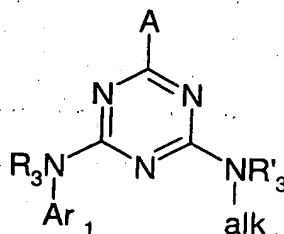
14 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone.

15 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl.

16 - Composés de la revendication 1 pour une utilisation comme agent inhibiteur des télomérases.

17- Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes pour une utilisation anticancéreuse.

18 - Composés nouveaux répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- A représente

5

- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou

10

- un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 représente l'hydrogène ou a la même signification que précédemment ou

- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe trifluorométhyle ou

- un atome d'hydrogène ou

- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode

- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C1-C4

- Ar , représente

15

- le cycle aromatique azoté, représente :

- une quinoléine éventuellement substituée par au moins

- un groupe $\text{N}(\text{Ra})(\text{Rb})$ dans lequel Ra et Rb , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

20

- un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment

- une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

- une benzamidine ou

25

- une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4

30

- alk représente une chaîne hydrocarbonée, éventuellement substituée, non aromatique, choisie parmi les chaîne alkyle (C1-C4), alkényle (C2-C4), linéaires ou ramifiées, cycloalkyle (C3-C18),

cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18) incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR³ ou un de ses sels.

5 19 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, 10 alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle, alkylaminocarbonyle et/ou arylaminocarbonyle, dialkylaminocarbonyle, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.

15 20 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que Ar₁ représente un groupe choisi parmi les groupes suivants : 4-amino- ou 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino-quinolyl ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

20 21 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que les groupes A représentent le radical thiométhyl, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4 atomes de carbone.

22 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que R₁ et R₂ représentent l'hydrogène.

23 - Composés selon la revendication 21 caractérisés en ce que A représente un groupe méthylthio.

25 24 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que alk représente un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, 30 dialkylamino, diarylamino, ou un motif hétérocyclyle ou cycloalkyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18) incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR³ ou un de ses sels.

19 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle, alkylaminocarbonyle et/ou arylaminocarbonyle, dialkylaminocarbonyle, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.

20 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que Ar, représente un groupe choisi parmi les groupes suivants : 4-amino- ou 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino-quinolyl ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

21 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que les groupes A représentent le radical thiométhyl, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4 atomes de carbone.

22 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que R¹ et R² représentent l'hydrogène.

23 - Composés selon la revendication 21 caractérisés en ce que A représente un groupe méthylthio.

24 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que alk représente un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, un motif-alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, ou un motif hétérocyclyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone.

25 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone.

26 - Composés selon la revendication 24 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl.

27 - Utilisation des composés de la revendication 18 comme produit pharmaceutique à usage humain.

28 - Associations thérapeutiques constituées d'un composé selon la revendication 1 et d'un autre composé anticancéreux.

29 - Associations selon la revendication 28 caractérisées en ce que le composé anticancéreux est choisi parmi les agents alkylants, les dérivés du platine, les agents antibiotiques, les agents antimicrotubules, les anthracyclines, les topoisomérases des groupes I et II, les fluoropyrimidines, les analogues de cytidine, les analogues d'adénosine, les enzymes et composés divers tels que la L-asparaginase, l'hydroxyurée, l'acide trans-rétinoïque, la suramine, l'irinotecan, le topotecan, la dexrazoxane, l'amifostine, l'herceptin ainsi que les hormones oestrogéniques, androgéniques.

30 - Association thérapeutique constituée d'un composé selon la revendication 1 et de radiations.

31 - Associations selon l'une quelconque des revendications 29 à 30 caractérisées en ce que chacun des composés ou des traitements est administré simultanément, séparément ou séquentiellement.


DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 3..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST 01001	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0100205	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT ANTITELOMERASE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
AVENTIS PHARMA S.A. 20 avenue Raymond Aron 92160 ANTONY			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MAILLIET	
Prénoms		Patrick	
Adresse	Rue	87 rue Dalayrac	
	Code postal et ville	94120	FONTENAY SOUS BOIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		RIOU	
Prénoms		Jean-François	
Adresse	Rue	8 avenue du Général Leclerc	
	Code postal et ville	75014	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ALASIA	
Prénoms		Marcel	
Adresse	Rue	Résidence Les Pages 40 rue Auguste Blanqui	
	Code postal et ville	94600	CHOISY LE ROI
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Aventis Pharma S.A. Fondé de Pouvoir  </div>	
Antony, le 17 janvier 2001		Magali LE PENNEC	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DÉPARTEMENT DES BREVETS

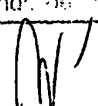
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 3.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 250899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST 01001	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0100205	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT ANTITELOMERASE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
AVENTIS PHARMA S.A. 20 avenue Raymond Aron 92160 ANTONY			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CAULFIELD	
Prénoms		Thomas	
Adresse	Rue	7 rue Raffet	
	Code postal et ville	75016	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DOERFLINGER	
Prénoms		Gilles	
Adresse	Rue	Résidence Les Millepertuis, Bât. B3	
	Code postal et ville	91940	LES ULIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		PETITGENET	
Prénoms		Odile	
Adresse	Rue	31 rue du Moulin Vert	
	Code postal et ville	75014	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Aventis Pharma S.A. Fondé de pouvoir </div>  Magali LE PENNEC	
Antony, le 17 janvier 2001			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DÉPARTEMENT DES BREVETS

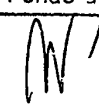
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3 / 3

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST 01001	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0100205	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT ANTITELOMERASE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
AVENTIS PHARMA S.A. 20 avenue Raymond Aron 92160 ANTONY			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		RENOU	
Prénoms		Emmanuelle	
Adresse	Rue	19 rue de Reuilly	
	Code postal et ville	75012	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MERGNY	
Prénoms		Jean-Louis	
Adresse	Rue	25 rue Delescluze	
	Code postal et ville	94800	VILLEJUIF
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LAOUI	
Prénoms		Abdelazize	
Adresse	Rue	80 rue de Coulmiers	
	Code postal et ville	94130	NOGENT SUR-MARNE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Aventis Pharma S.A. Fondé de Pouvoir </div>  Magali LE PENNEC	
Antony, le 17 janvier 2001			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'information, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.
1300 I Street, N.W.
Washington, D.C. 20005

SERIAL NO: 10/040, 370

DOCKET NO: 03806.0533

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 819 255

⑫ N° d'enregistrement national : **01 00205**

⑮ Int Cl⁷ : C 07 D 401/12, C 07 D 401/14, 471/08, A 61 K 31/53, A 61 P 35/00 // (C 07 D 401/12, 251:00, 215:42) (C 07 D 401/14, 251:00, 215:42, 211:58) (C 07 D 471/08, 211:56, 211:14) (C 07 D 401/14, 251:00, 215:42, 207:09) (C 07 D 401/14, 251:00, 215:42, 211:34) (C 07 D 401/14, 251:00, 215:42, 213:72)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 09.01.01.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 12.07.02 Bulletin 02/28.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : AVENTIS PHARMA SA Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : MAILLIET PATRICK, RIOU JEAN FRANCOIS, ALASIA MARCEL, CAULFIELD THOMAS, DOERFLINGER GILLES, PETITGENET ODILE, RENOU EMMANUELLE, MERGNY JEAN LOUIS et LAOUI ABDELAZIZE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT ANTITELOMERASE.

⑤⑦ La présente invention est relative à la thérapie du cancer et concerne de nouveaux agents anticancéreux ayant un mécanisme d'action bien particulier. Elle concerne aussi de nouveaux composés chimiques ainsi que leur application thérapeutique chez l'homme.

FR 2 819 255 - A1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

DERIVES CHIMIQUES ET LEUR APPLICATION COMME AGENT
ANTITELOMERASE

La présente invention est relative à la thérapie du cancer et concerne de nouveaux agents anticancéreux ayant un mécanisme d'action bien particulier. Elle concerne aussi de nouveaux composés chimiques ainsi que leur application thérapeutique chez l'homme.

La présente invention concerne l'utilisation de nouveaux composés chimiques non nucléotidiques qui interagissent avec des structures spécifiques de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces nouveaux composés sont constitués d'un agent répartiteur lié à un groupe aminoaromatique. Ces nouveaux composés sont utiles dans le traitement des cancers et agissent en particulier en tant qu'agents inhibiteurs de la télomérase. Ils sont particulièrement utiles pour stabiliser l'ADN en structure G-quadruplexe (tétrades de guanines). L'application thérapeutique de l'inhibition de la télomérase via la stabilisation de ces G-quadruplexes est l'arrêt de la mitose cellulaire et la mort des cellules à division rapide telles que les cellules cancéreuses et éventuellement l'induction de la sénescence des cellules cancéreuses.

Les composés de la présente invention présentent l'avantage du point de vue thérapeutique de bloquer la télomérase. Du point de vue biologique, la télomérase permet l'ajout de séquences d'ADN répétées du type T T A G G G, dites séquences télomériques, à l'extrémité du télomère, lors de la division cellulaire. Par cette action la télomérase rend la cellule immortelle. En effet, en l'absence de cette activité enzymatique, la cellule perd à chaque division 100 à 150 bases, ce qui la rend rapidement sénescence. Lors de l'apparition de cellules cancéreuses à division rapide, il est apparu que ces cellules présentaient des télomères maintenus à une longueur stable au cours de la division cellulaire. Dans ces cellules cancéreuses il est apparu que la télomérase était fortement activée et qu'elle permettait l'addition de motifs répétés de séquences télomériques à la fin du télomère et permettait donc la conservation de la longueur du télomère dans les cellules cancéreuses. Il est apparu depuis quelques temps que plus de 85 % des cellules cancéreuses présentaient des tests positifs à la présence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

de télomérase alors que les cellules somatiques ne présentent pas cette caractéristique.

Ainsi la télomérase est une cible très convoitée pour traiter les cellules cancéreuses. La première approche évidente pour bloquer la télomérase a été l'utilisation de structures nucléotidiques (Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(7), 2635-2639). Parmi les composés non nucléotidiques qui ont été utilisés dans l'art antérieur on peut citer les diaminoanthraquinones (Sun et al. J. Med. Chem. 40(14), 2113-6) ou les diethyloxadicarbocyanines (Wheelhouse R. T. Et al. J. Am. Chem. Soc. 1998(120) 3261-2).

Le brevet WO 99/40087 décrit l'utilisation de composés qui interagissent avec les structures G-quadruplexes qui sont des composés pérylènes et des carbocyanines contenant au moins sept cycles dont deux hétérocycles.

Il est apparu de façon tout-à-fait surprenante que des structures simples permettaient d'obtenir un résultat au moins équivalent avec des structures beaucoup moins compliquées du point de vue chimique. Les composés de la présente invention qui répondent à l'objectif visé c'est-à-dire qui fixent la structure G-quadruplex et par ce fait présentent une activité inhibitrice des télomérases répondent à la formule générale suivante :

cycle aromatique azoté - NR_3 - répartiteur - NR'_3 - chaîne hydrocarbonée non aromatique

dans laquelle

• le cycle aromatique azoté, représente :

- une quinoléine éventuellement substituée par au moins
 - un groupe $\text{N}(\text{Ra})(\text{Rb})$ dans lequel Ra et Rb, identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou
 - un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment
 - une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- o une benzamidine ou
 - o une pyridine
 - R3 et R'3, identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4
 - le répartiteur représente :
 - ◊ un groupe triazine éventuellement substitué par un radical alkyle ayant 1 à 4 atomes de carbone, un radical thio, oxy ou amino eux mêmes éventuellement substitués par une ou plusieurs chaînes alkyle à chaîne courte contenant 1 à 4 atomes de carbone ou encore un atome d'halogène ou
 - ◊ un groupe carbonyle ou
 - ◊ un groupe C(=NH)-NH-C(=NH) ou
 - ◊ un groupe alkylidyne contenant 3 à 7 atomes de carbone ou
 - ◊ un groupe diazine éventuellement substitué par les mêmes groupes que la triazine
- ou un de ses sels.
- On entend au sens de la formule ci-dessus par chaîne hydrocarbonée non aromatique une chaîne alkyle (C1-C4), alkényle (C2-C4), linéaire ou ramifiée, cycloalkyle (C3-C18), cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18). Le groupe hétérocycloalkyle inclut éventuellement l'atome d'azote.
- Il est évidemment entendu que la chaîne hydrocarbonée non aromatique peut être éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, alkyloxycarbonyl ou aryloxycarbonyl, aminocarbonyl, alkylaminocarbonyl et/ou

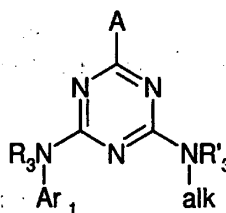
THIS PAGE BLANK (USPTO)

arylamino-carbonyl, dialkylaminocarbonyl, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.

Les chaînes alkyle des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent de préférence 1 à 4 atomes de carbone et les groupes ayles des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent de préférence 5 à 18 atomes de carbone.

On préfère parmi l'ensemble des composés ci-dessus inclus utiliser ceux comportant comme répartiteur un groupe triazine ou diazine. Parmi les groupes diazines on préfère utiliser les pyrimidines ou les quinazolines. Parmi les chaînes hydrocarbonée on préfère les chaînes alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone, les chaînes hétérocycloalkyles ou cycloalkyles contenant 4 à 7 atomes de carbone.

Parmi les triazines on préfère les composés répondant à la formule (I) ci-dessous :



dans laquelle :

- A représente

- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou
- un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 a la même signification que précédemment ou
- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou ou un groupe trifluorométhyle ou
- un atome d'hydrogène ou
- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- R3 et R'3, identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4.

- Ar, représente :

- le cycle aromatique azoté, représente :

- 5
 - une quinoléine éventuellement substituée par au moins
 - un groupe N(Ra)(Rb) dans lequel Ra et Rb, identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou
 - 10
 - un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment
 - une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou
 - une benzamidine ou
 - 15
 - une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4

- alk représente

- 20
 - un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino
 - un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino
 - 25
 - un motif hétérocyclyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

ou un de ses sels.

Il est évident que les motifs quinoléines peuvent être substitués par tout autre groupe n'intervenant pas dans l'application visée, ainsi des groupes acridines ou isoquinoléines ou quinazolines ou quinoxalines ou

THIS PAGE BLANK (USPTO)

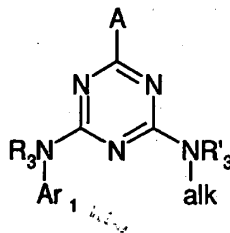
phtalazines ou benzothiazines ou benzoxazines ou phénoxazines ou phénothiazines sont inclus dans la définition des groupes quinoléines.

On préfère parmi les composés de formule (I) ci-dessus ceux qui comportent un hétérocycle choisi parmi les groupes 4-aminoquinolyl, 4-alkyl- ou 4-dialkylamino-quinolyl, 4-aminoquinolinium ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

En ce qui concerne les groupes A, ils représentent de préférence le radical méthylthio, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4 atomes de carbone.

En ce qui concerne la chaîne hydrocarbonée non aromatique, elle représente de préférence une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent de préférence 1 à 4 atomes de carbone, encore plus préférentiellement 1 à 2 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent de préférence 5 à 18 atomes de carbone, encore plus préférentiellement 6 atomes de carbone.

Un autre objet de la présente invention concerne les composés de formule (I) en tant que produits chimiques nouveaux. Il concerne donc les produits nouveaux répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- A représente

- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou

- un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 représente l'hydrogène ou a la même signification que précédemment ou

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe trifluorométhyle ou

- un atome d'hydrogène ou

- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode

5

- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C1-C4

- Ar , représente :

- le cycle aromatique azoté, représente :

10

- une quinoléine éventuellement substituée par au moins

- un groupe $N(Ra)(Rb)$ dans lequel Ra et Rb , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

15

- un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment

- une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

- une benzamidine ou

20

- une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4

- alk représente

- un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, ou diarylamino

25

- un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino

30

- un motif hétérocyclyle contenant de 5 à 7 atomes de carbone

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ou un de ses sels.

Les composés de formule (I) qui sont préférés sont ceux pour lesquels Ar₁ représente un groupe choisi parmi les motifs suivants : 4-amino- ou 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino-quinolyl ou quinolynium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

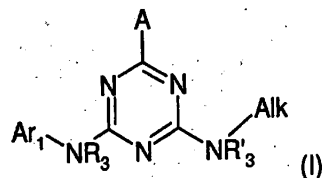
Les composés de formule générale (I) qui sont préférés sont ceux pour lesquels A représente un groupe amino ou diméthylamino ou plus préférentiellement méthylthio.

Les composés de formule générale (I) qui sont préférés sont ceux pour lesquels la chaîne hydrocarbonée non aromatique représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone, notamment 1 à 2 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone, notamment 6 atomes de carbone.

On préfère tout particulièrement les composés de formule générale (I) pour lesquels la chaîne hydrocarbonée non aromatique représente une chaîne 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl telle que la chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl

Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation des composés de la formule (I) comme produit pharmaceutique à usage humain.

Les procédés de préparation des composés de formule (I)



sont décrits ci-après.

Dans le cas où Ar₁ et Alk sont présents, la triazine de formule générale (A) peut être obtenue par déplacement séquentiel des atomes d'halogène, très généralement des atomes de chlore, des produits de formule générale (B) par les amines Ar₁ puis Alk de formule générale (C) selon le

THIS PAGE BLANK (USPTO)

schéma 1 :

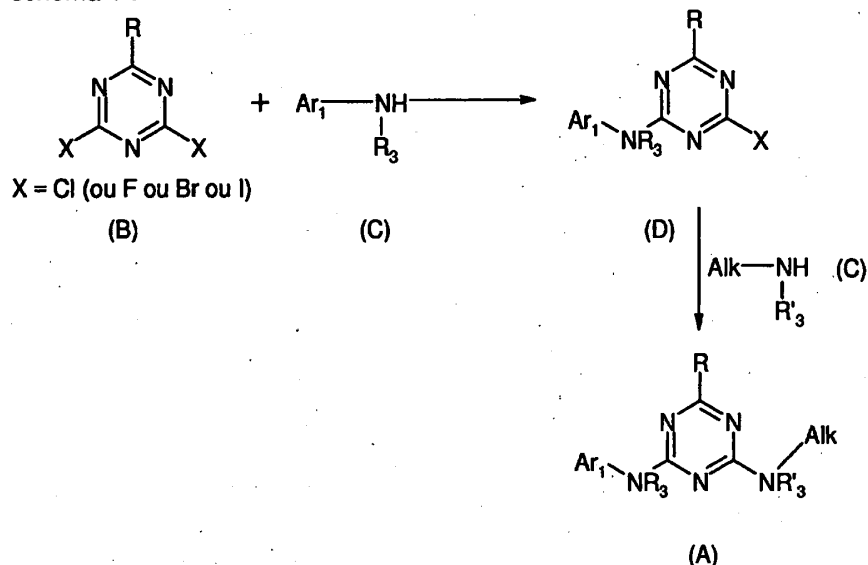


Schéma 1

Généralement on opère avec 1 mole de dihalogéno-s-triazine, ou trihalogéno-s-triazine, et 1 mole d'amine Ar₁. On préfère opérer dans un solvant inerte tel que l'acétone éventuellement aqueux ou un alcool éventuellement aqueux, comme l'éthanol, ou un solvant halogéné, tel que le dichlorométhane, ou un éther tel que l'oxyde de diéthyle ou le dioxane, ou un solvant aprotique polaire tel que le DMF le DMSO ou la NMP. Selon une meilleure manière de mettre en oeuvre l'invention on opère à une température comprise entre 20°C et 50°C. Ensuite on ajoute 1 mole d'amine Alk au produit de formule générale (D), qui peut être éventuellement isolé. On opère notamment à une température comprise entre 50°C et le reflux.

Avantageusement, on peut opérer dans les conditions décrites dans J. Fluor. Chem., 1988, 39(1), 117-123.

Méthode générale 2

Selon une seconde méthode les produits de formule générale (A) dans lesquels Ar sont définis tels que précédemment et R représente un groupe NR₁R₂ ou OR₁ ou SR₁ peuvent être également préparés par déplacement nucléophile d'un atome d'halogène, généralement un atome de

THIS PAGE BLANK (USPTO)

chlore, d'un produit de formule générale (A) dans lequel R représente un atome d'halogène selon le schéma 2 :

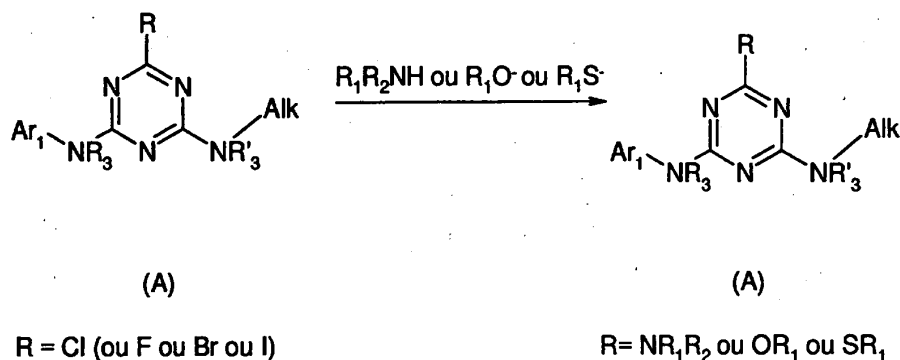


Schéma 2

- 5 On opère généralement en condensant 1 mole de produit de formule générale (A) dans lequel R représente un atome d'halogène, préférentiellement un atome de chlore, avec 1 mole d'amine R₁R₂NH ou d'alcoolate R₁O⁻ ou de thioalcoolate R₁S⁻. La réaction a lieu en milieu inerte dans les conditions de la réaction. On peut citer parmi les solvants inertes
- 10 l'acétone éventuellement aqueux ou un alcool éventuellement aqueux comme l'éthanol, ou un solvant halogéné tel que le dichlorométhane, ou un éther tel que l'oxyde de diéthyle ou le dioxane, ou un solvant aprotique polaire tel que le DMF le DMSO ou la NMP. Lorsque le groupe entrant représente un groupe R₁R₂NH, on opère de préférence à une température
- 15 comprise entre 20°C et le reflux, en présence notamment d'une base organique, telle que la triéthylamine, ou minérale, telle que la soude ou le carbonate de sodium ou de potassium. Il est également possible de ne pas utiliser de base lors de la réaction d'amination, et d'isoler un chlorhydrate du produit de formule générale (A), dont la base peut ensuite être libérée.
- 20 Lorsque le groupe entrant représente un groupe R₁O⁻ ou R₁S⁻ on opère préférentiellement avec un alcoolate ou un thioalcoolate alcalin ou alcalinoterreux, tel qu'un sel de sodium ou de potassium ou de lithium ou d'ammonium ou de césium ou de baryum, dans un solvant aprotique polaire tel que le DMF ou le DMSO ou la NMP, à une température comprise entre
- 25 50°C et le reflux.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Méthode générale 3

Selon un troisième procédé de préparation les composés pour lesquels R représente un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle, droit ou ramifié contenant de 1 à 4 atomes de carbone, peuvent également être préparés par condensation d'un bisguanide de formule générale (E), avec un dérivé d'acide, préférentiellement un chlorure d'acide ou un ester de méthyle de formule générale (F) selon le schéma 3 :

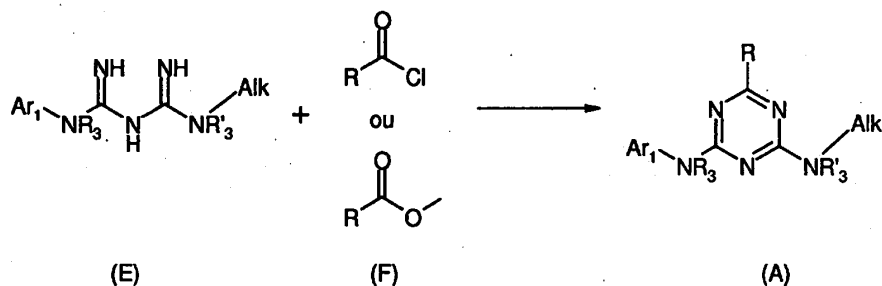


Schéma 3

La condensation entre le bisguanide de formule générale (E) et le dérivé d'acide de formule générale (F) est effectuée généralement dans un alcool comme le méthanol ou l'éthanol. On préfère opérer à une température comprise entre 0°C et la température de reflux.

Les bisguanides de formule générale (E) symétriques ou dissymétriques peuvent être obtenus en opérant dans les conditions décrites dans la littérature et en particulier selon le brevet J.P. 94-4993.

Méthode générale 4

Il est entendu que les s-triazines de formule générale peuvent être obtenues sous forme de bibliothèques, en appliquant les méthodes décrites dans les schémas 1, 2, 3, 4 ou 5 en chimie parallèle et/ou combinatoire en phase liquide ou en phase solide, étant entendu que, lorsqu'on travaille en phase solide, l'un quelconque des réactifs est préalablement fixé sur un support solide, choisi en fonction de la réaction chimique mise en jeu, et que ladite réaction chimique est suivie d'une opération de clivage du produit de la réaction du support solide.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

La présente invention concerne aussi les compositions thérapeutiques contenant un composé selon l'invention, en association avec un support pharmaceutiquement acceptable selon le mode d'administration choisi. La composition pharmaceutique peut se présenter sous forme solide,
5 liquide ou de liposomes.

Parmi les compositions solides on peut citer les poudres, les gélules, les comprimés. Parmi les formes orales on peut aussi inclure les formes solides protégées vis-à-vis du milieu acide de l'estomac. Les supports utilisés pour les formes solides sont constitués notamment de supports minéraux
10 comme les phosphates, les carbonates ou de supports organiques comme le lactose, les celluloses, l'amidon ou les polymères. Les formes liquides sont constituées de solutions de suspensions ou de dispersions. Elles contiennent comme support dispersif soit l'eau, soit un solvant organique (éthanol, NMP ou autres) ou de mélanges d'agents tensioactifs et de solvants ou d'agents
15 complexants et de solvants.

La dose administrée des composés de l'invention sera adaptée par le praticien en fonction de la voie d'administration du patient et de l'état de ce dernier.

Les composés de la présente invention peuvent être administrés
20 seuls ou en mélange avec d'autres anticancéreux. Parmi les associations possibles on peut citer

- les agents alkylants et notamment le cyclophosphamide, le melphalan, l'ifosfamide, le chlorambucil, le busulfan, le thiotepa, la prednimustine, la carmustine, la lomustine, la semustine, la
25 steptozotocine, la decarbazine, la témozolomide, la procarbazine et l'hexaméthylmélamine

- les dérivés du platine comme notamment le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine

- les agents antibiotiques comme notamment la
30 bléomycine, la mitomycine, la dactinomycine,

- les agents antimicrotubules comme notamment la vinblastine, la vincristine, la vindésine, la vinorelbine, les taxoides (paclitaxel et docétaxel)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- les anthracyclines comme notamment la doxorubicine, la daunorubicine, l'idarubicine, l'épirubicine, la mitoxantrone, la losoxantrone
- les topoisomérases des groupes I et II telles que l'étoposide, le teniposide, l'amsacrine, l'irinotecan, le topotecan et le tomudex,
- les fluoropyrimidines telles que le 5-fluorouracile, l'UFT, la floxuridine,
- les analogues de cytidine telles que la 5-azacytidine, la cytarabine, la gemcitabine, la 6-mercaptopurine, la 6-thioguanine
- les analogues d'adénosine telles que la pentostatine, la cytarabine ou le phosphate de fludarabine
- le methotrexate et l'acide folinique
- les enzymes et composés divers tels que la L-asparaginase, l'hydroxyurée, l'acide trans-rétinoïque, la suramine, la dexrazoxane, l'amifostine, l'herceptin ainsi que les hormones oestrogéniques, androgéniques.

Il est également possible d'associer aux composés de la présente invention un traitement par les radiations. Ces traitements peuvent être administrés simultanément, séparément, séquentiellement. Le traitement sera adapté au malade à traiter par le praticien.

L'activité de stabilisation des G-quadruplexes peut être déterminée par une méthode utilisant la formation d'un complexe avec la fluoresceine dont le protocole expérimental est décrit ci-après.

25 Oligonucléotides

Tous les oligonucléotides, modifiés ou non, ont été synthétisés par Eurogentec SA, Seraing, Belgique. L'oligonucléotide FAM + DABCYL porte la référence catalogue, OL-0371-0802. Il possède la séquence: GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG correspondant à 3.5 répétitions du motif télomérique humain (brin riche en G). La fluoresceine est attaché à l'extrémité 5', le DABCYL à l'extrémité 3', par les bras chimiques décrit par Eurogentec. La concentration des échantillons est vérifiée par

THIS PAGE BLANK (USPTO)

spectrophotométrie, en enregistrant le spectre d'absorbance entre 220 et 700 nm et en utilisant le coefficient d'extinction molaire fourni par le fournisseur.

Tampons

- 5 Toutes les expériences ont été réalisées dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7.6 contenant 0.1 M de Chlorure de Lithium (ou de Chlorure de Sodium). L'absence de contamination fluorescente dans le tampon a été préalablement vérifiée. L'oligonucléotide fluorescent est ajouté à la concentration finale de 0.2 μ M.

10 Etude de Fluorescence

- Toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un appareil Spex Fluorolog DM1B, en utilisant une largeur de raie d'excitation de 1.8 nm et une largeur de raie d'émission de 4.5 nm. Les échantillons sont placés dans une cuvette en quartz micro de 0.2 x 1 cm. La température de l'échantillon est contrôlée par un bain-marie extérieur. L'oligonucléotide seul a été analysé à 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80°C. Les spectres d'émission sont enregistrés en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 470 nm. Les spectres d'excitation sont enregistrés en utilisant soit 515 nm soit 588 nm comme longueur d'onde d'émission. Les spectres sont corrigés de la réponse de l'instrument par des courbes de référence. Une extinction importante (80-90 %) de la fluorescence de la fluoresceine à température ambiante est observée, en accord avec un repli intramoléculaire de l'oligonucléotide à 20°C sous forme d'un G-quadruplex, ce qui induit une juxtaposition de ses extrémités 5' et 3', respectivement liées à la fluoresceine et au DABCYL.
- 25 Cette juxtaposition entraîne un phénomène déjà décrit d'extinction de fluorescence, utilisé pour les "Molecular Beacons".

Tm en fluorescence :

- Une solution stock d'oligonucléotide à la concentration en brin de 0.2 μ M dans un tampon 0.1 M LiCl 10. mM cacodylate pH 7.6 est préalablement préparée, chauffée brièvement à 90°C et refroidie lentement à 20°C, puis distribuée par aliquots de 600 μ l dans les cuves de fluorescence.
- 30 3 μ l d'eau (pour le contrôle) ou 3 μ l du produit à tester (stock à 200 μ M,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

concentration finale 1 μ M) sont alors ajoutés et mélangés. Les échantillons sont alors laissés à incuber pendant au moins 1 heure à 20°C avant chaque mesure. L'utilisation de temps d'incubation plus longs (jusqu'à 24 heures) n'a pas d'influence sur le résultat obtenu.

- 5 Chaque expérience ne permet que la mesure d'un seul échantillon. Celui-ci est d'abord incubé à une température initiale de 20°C, porté à 80°C en 38 minutes, laissé 5 minutes à 80°C, puis refroidi à 20°C en 62 minutes. Durant ce temps, la fluorescence est mesurée simultanément à deux longueurs d'onde d'émission (515 nm et 588 nm) en utilisant 470 nm comme
- 10 longueur d'onde d'excitation. Une mesure est effectuée toutes les 30 secondes. La température du bain-marie est enregistrée en parallèle, et le profil de fluorescence en fonction de la température est reconstitué à partir de ces valeurs. Les profils de fluorescence sont ensuite normalisés entre 20°C et 80°C, et la température pour laquelle l'intensité d'émission à 515 nm
- 15 est la moyenne de celles à haute et basse température est appelée T_m . Dans ces conditions, le T_m de l'échantillon de référence sans addition de produit est de 44°C dans un tampon Chlorure de Lithium. Cette température est portée à plus de 55°C dans un tampon Chlorure de Sodium. L'addition d'un composé stabilisant le G-quadruplex induit une augmentation du T_m .
- 20 Cette augmentation est jugée significative si elle est supérieure à 3°.

L'activité biologique antitélomérase est déterminée par le protocole expérimental suivant :

Préparation de l'extrait enrichi en activité télomérase humaine

- 25 La lignée de leucémie HL60 est obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville USA). Les cellules sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI 1640 contenant, L-Glutamine à 2 mM, Penicilline 200 U/ml, streptomycine 200 μ g/ml, gentamycine 50 μ g/ml et additionné de 10 % de sérum fœtal de veau inactivé par la chaleur.

- 30 Une aliquote de 10^5 cellules est centrifugée à 3000xG et le surnageant écarté. Le culot de cellules est resuspendu par plusieurs pipettages successifs dans 200 μ l de tampon de lyse contenant CHAPS 0.5 %, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, $MgCl_2$ 1mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoethanol 5 mM, PMSF 0.1 mM et glycérol 10 % et est conservé dans la glace pendant

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30 minutes. Le lysat est centrifugé à 16 000xG pendant 20 minutes à 4°C et 160 µl du surnageant est récupéré. Le dosage des protéines de l'extrait est effectué par la méthode de Bradford. L'extrait est conservé à -80°C.

Dosage de l'activité télomérase

- 5 L'inhibition de l'activité télomérase est déterminée par un protocole d'extension de l'oligonucléotide TS (⁵AATCGTTCGAGCAGAGTT³), en présence d'un extrait cellulaire enrichi en activité télomérase et des composés qui sont ajoutés à différentes concentrations (10, 1, 0.1 et 0,01 µg/ml). La réaction d'extension est suivie d'une amplification PCR des
- 10 produits d'extension à l'aide des oligonucléotides TS et CXext (⁵GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA³).

Le milieu réactionnel est préparé selon la composition suivante :

	Tris HCl pH 8,3	20 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
15	Tween 20	0,005 % (P/V)
	EGTA	1 mM
	dATP	50 µM
	dGTP	50 µM
	dCTP	50 µM
20	dTTP	50 µM
	Oligonucléotide TS	2 µg/ml
	Oligonucléotide CXext	2 µg/ml
	Sérum Albumine bovine	0,1 mg/ml
	Taq DNA polymérase	1 U/ml
25	alpha 32P dCTP (3000 Ci/mme)	0.5 µl
	Extrait télomérase	200 ng sous un volume de 10 µl
	Produit à tester ou solvant	sous un volume de 5 µl
	Eau bi-distillée QS	50 µl

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Les oligonucléotides sont obtenus auprès d'Eurogentec (Belgique) et sont conservés à -20°C à une concentration stock de 1 mg/ml dans de l'eau distillée.

- 5 Les échantillons réactionnels sont assemblés dans des tubes à PCR de 0.2 ml et une goutte d'huile de paraffine est déposée sur chacune des réactions de l'expérience avant la fermeture des tubes.

Les échantillons réactionnels sont ensuite incubés dans un appareil à PCR de type Cetus 4800 selon les conditions de températures suivantes :

- 10 15 minutes à 30°C,
1 minute à 90°C,
suivis de 30 cycles de,
30 secondes à 94°C,
30 secondes à 50°C,
et 1 minute 30 secondes à 72°C,
15 suivis d'un cycle final de 2 minutes à 72°C.

Pour chacun des échantillons, une aliquote de 10 µl est pipetée sous la couche d'huile et mélangée avec 5 µl d'un tampon de dépôt contenant :

- | | | |
|----|---------------------|------------|
| 20 | TBE | 3X |
| | glycérol | 32 % (P/V) |
| | Bleu de bromophénol | 0.03 % |
| | Xylène cyanol | 0.03 % |

Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide 12 % dans un tampon TBE 1X pendant 1 heure sous une tension de 200 volts, à l'aide d'un système d'électrophorèse Novex.

- 25 Les gels d'acrylamides sont ensuite séchés sur une feuille de papier whatmann 3MM à 80°C pendant 1 heure.

L'analyse et la quantification des produits de la réaction sont effectuées à l'aide d'un appareil Instantimager (Pacard).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pour chaque concentration de composé testée, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la réaction et calculés à partir du contrôle enzymatique non traité et de l'échantillon sans enzyme (blanc) selon la formule suivante :

- 5 (Valeur Composé - valeur blanc/ Valeur contrôle enzymatique - valeur blanc) x 100.

- 10 La concentration de composé induisant une inhibition de 50 % de la réaction télomérase (IC50) est déterminée à l'aide d'une représentation graphique semi logarithmique des valeurs d'inhibition obtenues en fonction de chacune des concentrations de composé testée.

On considère qu'un composé est actif en tant qu'agent antitélomérase lorsque la quantité inhibant 50 % de la réaction télomérase est notamment inférieure à 5 µM.

- 15 L'activité biologique cytotoxique sur des lignées de tumeur humaines est déterminée selon le protocole expérimental suivant :

- 20 Les lignées de cellules humaines KB et A549 sont originaires de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville USA). Les cellules A549 sont cultivées en couche en flacon de culture dans du milieu RPMI 1640, L-Glutamine à 2 mM, Penicilline 200 U/ml, streptomycine 200 µg/ml et additionné de 10 % de sérum fœtal de veau inactivé par la chaleur. Les cellules KB sont cultivées en couche en flacon de culture dans du milieu de Dulbelco's contenant, L-Glutamine à 2 mM, Penicilline 200 U/ml, streptomycine 200 µg/ml et additionné de 10 % de sérum fœtal de veau inactivé par la chaleur.

- 25 Les cellules en phase exponentielles de croissances sont trypsinées, lavées dans du PBS 1X et sontensemencées en microplaques 96 puits (Costar) à raison de 4×10^4 cellules/ml pour A549 et de $1,5 \times 10^4$ cellules/ml (0.2 ml/puit) puis incubées pendant 96 heures en présence de concentrations variables de produit à étudier (10, 1, 0.1 et 0.01 µg/ml, chaque point en quadruplicata). 16 heures avant la fin de l'incubation, 0.02 % final de rouge neutre est ajouté dans chaque puits. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées par du PBS 1X et lysées par 1 % de lauryl sulfate de sodium. L'incorporation cellulaire du colorant, qui reflète la croissance cellulaire, est
- 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm pour chaque échantillon à l'aide d'un appareil de lecture Dynatech MR5000.

Pour chaque concentration de composé testé, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de croissance cellulaire et calculés à partir du contrôle non traité et du milieu de culture sans cellules (blanc) selon la formule suivante :

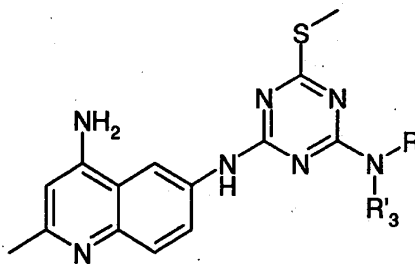
$$\frac{(\text{Valeur Composé} - \text{valeur blanc})}{(\text{Valeur contrôle cellules} - \text{valeur blanc})} \times 100.$$

La concentration de composé induisant une inhibition de 50 % de la croissance (IC50) est déterminée à l'aide d'une représentation graphique semi logarithmique des valeurs d'inhibition obtenues en fonction de chacune des concentrations de composé testée.

On considère qu'un composé est actif comme agent cytotoxique si la concentration inhibitrice de 50 % de la croissance des cellules tumorales testées est notamment inférieure à 10 μM .

Les exemples suivants et non limitatifs sont donnés pour illustrer l'invention.

Exemple 1 : Synthèse en parallèle de dérivés substitués de N6-[6-amino-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine



Préparation de la N6-(6-chloro-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine

Dans un tricol de 1 litre, à une solution de 5 g (25 mmoles) de 2,6-dichloro-6-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazine, qui peut être préparée selon J. Amer. Chem.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Soc., 1945, 67, 662, dans 400 ml de tétrahydrofurane, on ajoute successivement 4,4 g (25 mmoles) de 2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, qui peut être préparée selon J. Med. Chem. 1992, 35, 252, et 2,8 g (25 mmoles) de carbonate de sodium. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 16 heures. Après évaporation du tétrahydrofurane, le résidu est repris par 400 ml d'un mélange d'eau et de dichlorométhane (50-50 en volumes). La phase organique est décantée, séchée sur sulfate de sodium et concentrée à sec sous pression réduite. On obtient alors 7,5 g (88 %) de N6-(6-chloro-4-méthylsulfanyl-triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, sous forme d'un solide jaune pâle dont les caractéristiques sont les suivantes :

- point de fusion = 294°C

- spectre de RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂SO d₆, δ en ppm) : 2,43 (s : 3H) ; 2,52 (s : 3H) ; 6,47 (s : 1H) ; 6,61 (mf : 2H) ; 7,62 (d large, J = 9 Hz : 1H) ; 7,69 (d, J = 9 Hz : 1H) ; 8,32 (mf : 1H) ; 10,80 (mf : 1H).

15 Synthèse en parallèle de N6-[6-(2-diméthylamino-éthylamino)-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine (exemple 1-1)

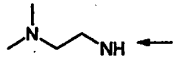
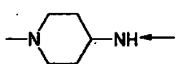
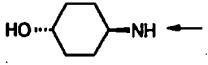
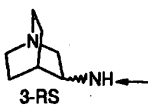
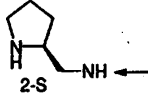
Dans un réacteur magnétique chauffant avec condenseur Zymark, de type STEM RS2050 contenant 25 puits en parallèle munis chacun d'un tube en verre de 50 ml, on introduit 50 mg (0,15 mmole) de N6-(6-amino-4-méthylsulfanyl-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthylquinoline-4,6-diamine. Dans le premier tube (exemple 1-1), on ajoute successivement 5 ml de dioxane, 16 mg (0,15 mmole) de carbonate de sodium, 23 mg (0,15 mmole) d'iodure de sodium et 27 mg (0,3 mmole) de 2-diméthylamino-éthylamine. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux sous argon pendant 24 heures. Après refroidissement, le contenu du tube est évaporé sous pression réduite, repris par 5 ml d'eau et 5 ml d'acétate d'éthyle et filtré. La phase organique est décantée, séchée et concentrée sous pression réduite. Le produit brut obtenu est alors purifié par LC/MS en utilisant une colonne de silice C18 Waters Xterra 3.5 μM, de diamètre 3 mm et de longueur 50 mm, en éluant par un gradient linéaire d'élution constitué au temps initial (t₀ = 0 mn) par de l'eau contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique et au temps final (t_f = 4 mn) par de l'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique. On obtient ainsi, après purification, 58 mg de trifluoroacétate de N6-[(6-(méthyl-quinolin-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

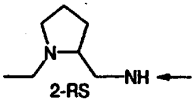
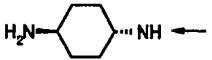
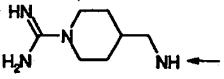
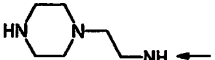
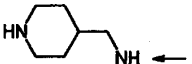
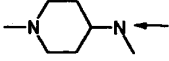
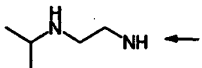
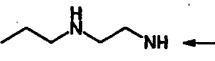
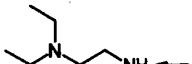
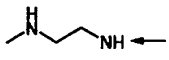
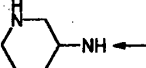
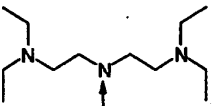
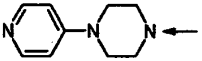
6-yl-amino)-4-méthylthio-triazin-2-yl]-quinaldine-4,6-diamine, dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de masse (DAD-TIC) = 454 (MH⁺)
 - temps de rétention = 2,69 mn (les temps de rétention sont obtenus sur
- 5 Colonne hypersil C18 5 µm 50 mm diamètre 4.6 mm marque Purity Elite en éluant avec un mélange de solvants A (H₂O/TFA 0.05 %) et B (ACN/TFA 0.05 %) avec un gradient linéaire allant de 95 % A/5 % B (t = 0 mn) à 10 % A/90 % B à t= 3,5 mn puis palier 2 mn).

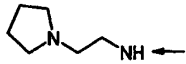
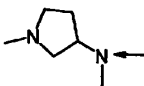
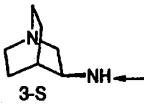
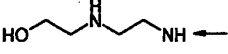
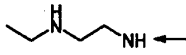
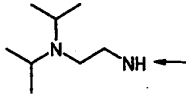
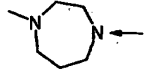
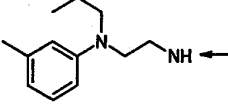
- 10 Les exemples 1-1 à 1-26 ont été obtenus en opérant comme ci-dessus dans un réacteur Zymark STEM RS2050. Les structures, les diverses conditions opératoires utilisées et les caractéristiques des exemples 1-1 à 1-26 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Exemple	Structure	Conditions réactionnelles			Caractéristiques	
		Solvant	Chauffage	Nbre de mmoles d'amine	Masse MH ⁺	Temps de Rétention (mn)
1-1		dioxane	17 h./100°	0,3	384	2,69
1-2		dioxane	17 h./100°	0,3	410	2,91
1-3	 racémique trans	dioxane	17 h./100°	0,15	411	2,86
1-4	 3-RS	dioxane	3 j./100°	0,45	422	2,85
1-5	 2-S	dioxane	17 h./100°	0,15	396	2,84

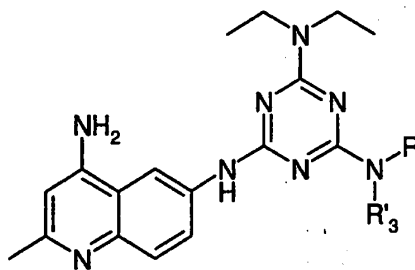
THIS PAGE BLANK (USPTO)

1-6		dioxane	17 h./100°	0,15	424	2,79
1-7	 racémique trans	dioxane	17 h./100°	0,15	410	2,72
1-8		dioxane	2 j./100°	0,3	452	2,81
1-9		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	425	2,43
1-10		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	410	2,51
1-11		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	424	2,50
1-12		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	398	2,46
1-13		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	398	2,48
1-14		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	412	2,47
1-15		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	384	2,48
1-16		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	396	2,49
1-17		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	511	2,38
1-18		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h./100°	0,3	459	2,62

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1-19		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	410	2,44
1-20		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	410	2,52
1-21		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	422	2,55
1-22		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	400	2,36
1-23		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	384	2,40
1-24		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	440	2,58
1-25		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	410	2,48
1-26		dioxane 10 ml/DMF 1 %	24 h/100°	0,3	474	2,86

Exemple 2 : Synthèse en parallèle de dérivés substitués de N6-[6-amino-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Préparation de la N6-(6-chloro-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine

Dans un tricol de 1 litre, à une solution de 5 g (22,5 mmoles) de 2,6-dichloro-4-diéthylamino-[1,3,5]triazine commerciale dans 300 ml de tétrahydrofurane, on ajoute successivement 3,91 g (22,5 mmoles) de 2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, qui peut être préparée selon J. Med. Chem. 1992, 35, 252, et 2,4 g (22,5 mmoles) de carbonate de sodium. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 20 heures. Après évaporation du tétrahydrofurane, le résidu est repris par 400 ml d'un mélange d'eau et de dichlorométhane (50-50 en volumes). La phase organique est décantée, séchée sur sulfate de sodium et concentrée à sec sous pression réduite. On obtient alors 7,4 g (92 %) de N6-(6-chloro-4-diéthylamino-triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, sous forme d'un solide jaune dont les caractéristiques sont les suivantes :

- point de fusion = 120°C
- spectre de RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂SO d₆, δ en ppm) : 1,14 (mt : 6H) ; 2,42 (s : 3H) ; de 3,50 à 3,70 (mt : 4H) ; 6,47 (s et mf : 3H en totalité) ; 7,54 (d large, J = 9 Hz : 1H) ; 7,67(dd, J = 9 et 2 Hz : 1H) ; 8,27 (mf : 1H) ; 10,09 (mf : 1H).

Synthèse en parallèle de N6-[(6-(3-diméthylamino-propylamino)-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine
(exemple 2-1)

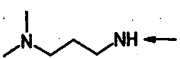
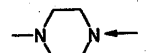
Dans un réacteur magnétique chauffant avec condenseur Zymark, de type STEM RS2050 contenant 25 puits en parallèle munis chacun d'un tube en verre de 50 ml, on introduit 50 mg (0,13 mmole) de N6-(6-chloro-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl)-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine. Dans le premier tube (exemple 2-1), on ajoute successivement 5 ml de DMF, 19 mg (0,14 mmole) de carbonate de potassium, 21 mg (0,14 mmole) d'iodure de sodium et 14 mg (0,14 mmole) de 3-diméthylamino-propylamine. Le milieu réactionnel est chauffé à 120°C sous argon pendant 16 heures. Après refroidissement, le contenu du tube est évaporé sous pression réduite, repris par 5 ml d'eau, filtré et lavé avec de l'oxyde de diéthyle. Le produit brut obtenu est alors purifié par LC/MS en utilisant une colonne de silice C18 Waters Xterra 3.5 µM, de diamètre 3 mm et de longueur 50 mm, en éluant

THIS PAGE BLANK (USPTO)

par un gradient linéaire d'élution constitué au temps initial ($t_0 = 0$ mn) par de l'eau contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique et au temps final ($t_f = 4$ mn) par de l'acétonitrile contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique. On obtient ainsi, après purification, 12 mg de N6-[(6-(3-diméthylamino-propylamino)-4-diéthylamino-[1,3,5]triazin-2-yl]-2-méthyl-quinoline-4,6-diamine, dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de masse (DAD-TIC) = 423 (MH⁺)
- temps de rétention = 0,79 mn (les temps de rétention sont obtenus sur Colonne hypersil C18 5 μ m 50 mm diamètre 4.6 mm marque Purity Elite en éluant avec un mélange de solvants A (H₂O/TFA 0.05 %) et B (ACN/TFA 0.05 %) avec un gradient linéaire allant de 95 % A/5 % B ($t = 0$ mn) à 10 % A/90 % B à $t = 3,5$ mn puis palier 2 mn).

Les exemples 2-1 à 2-2 ont été obtenus en opérant comme ci-dessus dans un réacteur Zymark STEM RS2050. Les structures, les diverses conditions opératoires utilisées et les caractéristiques des exemples 2-1 et 2-2 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Exemple	Structure	Conditions réactionnelles			Caractéristiques	
		Solvant	Chauffage	Nbre de mmoles d'amine	Masse MH ⁺	Temps de Rétention (mn)
2-1		DMF	16 h/120°	0,14	423	0,79
2-2		DMF	16 h/120°	0,14	421	0,79

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau de résultats biologiques

Exemple	TRAP télomérase IC50 μ M	G-4 ΔT_m $^{\circ}$ C	Cytotoxicité A549 IC50 μ M
1-1	0,79	6	
1-2	0,5	5.6	7.5
1-3	4,4	3.1	
1-4	0,1	5.6	
1-5	1,6	2.8	
1-6	1,36		
1-7	0,47		
1-8	0,98		8.5
1-9	1,64	7	
1-10	0,94	7	
1-11	1,1	4.5	
1-12	3,1		
1-13	2,9		
1-14	3,2		
1-15	4,6		
1-16	1,29		
1-17	1,6		
1-19	1		
1-20	3,1		
1-21	0,7		
1-22	3,2		
1-23	3,8		
1-24	3,9		
1-25	1,5		10
1-26	0,86	33	< 0.3
2-1	0,90	7.9	
2-2	5,4	2.4	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDECATIONS

1 - Composés fixant la structure G-quadruplex des télomères caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale suivante :

cycle aromatique azoté - NR_3 - répartiteur - NR'_3 - chaîne hydrocarbonée non

5 aromatique

dans laquelle

- le cycle aromatique azoté, représente :

- une quinoléine éventuellement substituée par au moins

10

- un groupe $\text{N}(\text{Ra})(\text{Rb})$ dans lequel Ra et Rb , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

- un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment

15

- une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou

- une benzamidine ou

- une pyridine

- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4

20

- le répartiteur représente :

- ◇ un groupe triazine éventuellement substitué par un radical alkyle ayant 1 à 4 atomes de carbone, un radical thio, oxy ou amino eux même éventuellement substitués par un ou plusieurs chaînes alkyle à chaîne courte contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un atome d'halogène ou

25

- ◇ un groupe carbonyle ou

- ◇ un groupe $\text{C}(=\text{NH})\text{-NH-C}(=\text{NH})$ ou

THIS PAGE BLANK (USPTO)

◊ un groupe alkylédiyle contenant 3 à 7 atomes de carbone
ou

◊ un groupe diazine éventuellement substitué par les
mêmes groupes que la triazine

5 ou un de ses sels.

2 - Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que le
répartiteur est choisi parmi les groupes triazine ou diazine.

3 - Composés selon la revendication 2 caractérisés en ce que les
groupes diazines sont des pyrimidines ou des quinazolines.

10 4 - Composés selon l'une des revendications précédentes
caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est choisie
parmi les chaîne alkyle (C1-C4), alkényle (C2-C4), linéaires ou ramifiées,
cycloalkyle (C3-C18), cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18)
incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR³.

15 5 - Composés selon la revendication 4 caractérisés en ce que la
chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un
ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les
radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio,
amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino,
20 guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle,
alkyloxy-carbonyl ou aryloxy-carbonyl, aminocarbonyl ;
alkylaminocarbonyl et/ou arylaminocarbonyl, dialkylaminocarbonyl,
alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.

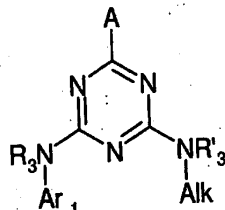
25 6 - Composés selon la revendication 5 caractérisés en ce que les
chaînes alkyle des substituants éventuels de la chaîne hydrocarbonée
contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryles des substituants
éventuels de la chaîne hydrocarbonée contiennent 5 à 18 atomes de
carbone.

30 7 - Composés selon la revendication 4 caractérisés en ce que parmi
les chaînes hydrocarbonées on préfère les chaînes alkyle contenant 2 à 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

atomes de carbone, les chaînes hétérocycloalkyles ou cycloalkyles contenant 5 à 7 atomes de carbone.

8 - Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule (I) ci-dessous :



5

dans laquelle :

- A représente

10

- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou
- un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 a la même signification que précédemment ou
- un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe trifluorométhyle ou
- un atome d'hydrogène ou
- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode

15

- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre l'hydrogène ou un groupe alkyle en C1-C4

20

- Ar_1 représente

- le cycle aromatique azoté, représente :

- une quinoléine éventuellement substituée par au moins
- un groupe $\text{N}(\text{Ra})(\text{Rb})$ dans lequel Ra et Rb , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- o un groupe ORa dans lequel Ra est défini comme précédemment
 - o une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou
 - 5 o une benzamidine ou
 - o une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4
 - 10 - alk représente une chaîne hydrocarbonée, éventuellement substituée, non aromatique choisie parmi les chaîne alkyle (C1-C4), alkényle (C2-C4), linéaires ou ramifiées, cycloalkyle (C3-C18), cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18) incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR³
- ou un de ses sels.
- 15 9 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que la chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, 20 guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle, alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle ; alkylaminocarbonyle et/ou arylaminocarbonyle, dialkylaminocarbonyle, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.
- 25 10 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que Ar, représente un groupe choisi parmi les groupes suivants : 4-amino- ou 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino- quinolyl ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.
- 30 11 - Composés selon la revendication 8 caractérisé en ce que les groupes A représentent le radical thiométhyl, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4 atomes de carbone.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que A représente un groupe méthylthio.

5 13 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino ou diarylamino, ou un motif hétérocyclyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

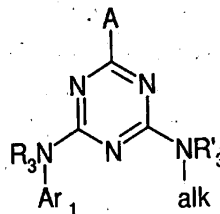
10 14 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone.

15 15 - Composés selon la revendication 8 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl.

16 - Composés de la revendication 1 pour une utilisation comme agent inhibiteur des télomérases.

20 17- Composés selon l'une quelconque des revendications précédentes pour une utilisation anticancéreuse.

18 - Composés nouveaux répondant à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

- A représente

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 5
- un groupe amino de formule NR_1R_2 dans lequel R_1 et R_2 identiques ou différents représentent un groupe alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone ou
 - un groupe OR_1 ou SR_1 dans lequel R_1 représente l'hydrogène ou a la même signification que précédemment ou
 - un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un groupe trifluorométhyle ou
 - un atome d'hydrogène ou
- 10
- un atome d'halogène choisi parmi le fluor, le chlore, le brome ou l'iode
- R_3 et R'_3 , identiques ou différents, représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C1-C4
- Ar_1 représente
- 15
- le cycle aromatique azoté, représente :
 - une quinoléine éventuellement substituée par au moins
 - un groupe $N(R_a)(R_b)$ dans lequel R_a et R_b , identiques ou différents représentent l'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 ou
 - un groupe OR_a dans lequel R_a est défini comme précédemment
 - une quinoléine possédant un atome d'azote sous forme quaternaire ou
 - une benzamidine ou
- 20
- une pyridine attachée en position -4 ou fusionnée avec un groupe aryle ou hétéroaryle éventuellement substituée par un groupe alkyle en C1-C4
- 25
- alk représente une chaîne hydrocarbonée, éventuellement substituée, non aromatique, choisie parmi les chaîne alkyle (C1-C4),
- 30
- alkényle (C2-C4), linéaires ou ramifiées, cycloalkyle (C3-C18),

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cycloalkényle (C3-C18), hétérocycloalkyle (C3-C18) incluant éventuellement l'atome d'azote du groupe NR'³ ou un de ses sels.

- 19 – Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que la
- 5 chaîne hydrocarbonée non aromatique est éventuellement substituée par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux hydroxy, aryle, hétéroaryle, alkyloxy, aryloxy, thio, alkylthio, arylthio, amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, amidino, guanidino, alkylcarbonylamino, ou arylcarbonylamino, carboxyle,
- 10 alkyloxycarbonyle ou aryloxycarbonyle, aminocarbonyle, alkylaminocarbonyle et/ou arylaminocarbonyle, dialkylaminocarbonyle, alkylcarbonyl ou arylcarbonyl, cyano et trifluorométhyle.

- 20 – Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que Ar, représente un groupe choisi parmi les groupes suivants : 4-amino- ou
- 15 4-méthylamino- ou 4-diméthylamino-quinolyl ou quinolinium dont le noyau quinolinium est éventuellement substitué par un groupe méthyle.

- 21 – Composés selon la revendication 18 caractérisé en ce que les groupes A représentent le radical thiométhyl, amino, alkylamino ou dialkylamino radicaux dans lesquels les groupes alkyle possèdent 1 à 4
- 20 atomes de carbone.

- 22 – Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que R1 et R2 représentent l'hydrogène.

- 23 – Composés selon la revendication 21 caractérisés en ce que A représente un groupe méthylthio.

- 24 – Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que alk
- 25 représente un motif alkyle contenant 2 à 3 atomes de carbone linéaire ou ramifié substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino, dialkylamino, diarylamino, un motif alkényle contenant 2 à 3 atomes de carbone, substitué par un radical amino, alkylamino et/ou arylamino,
- 30 dialkylamino, diarylamino, ou un motif hétérocyclyle contenant de 4 à 7 atomes de carbone

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25 - Composés selon la revendication 18 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(dialkylamino)éthyl, 3-(dialkylamino)propyl, 2-(N-alkyl-N-arylamino)éthyl ou 3-(N-alkyl-N-arylamino)propyl dans lesquels les groupes alkyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone et les groupes aryle contiennent 5 à 18 atomes de carbone.

26 - Composés selon la revendication 24 caractérisés en ce que alk représente une chaîne 2-(N-m.tolyl-N-éthyl-amino)éthyl.

27 - Utilisation des composés de la revendication 18 comme produit pharmaceutique à usage humain.

10 28 - Associations thérapeutiques constituées d'un composé selon la revendication 1 et d'un autre composé anticancéreux.

15 29 - Associations selon la revendication 28 caractérisées en ce que le composé anticancéreux est choisi parmi les agents alkylants, les dérivés du platine, les agents antibiotiques, les agents antimicrotubules, les anthracyclines, les topoisomérases des groupes I et II, les fluoropyrimidines, les analogues de cytidine, les analogues d'adénosine, les enzymes et composés divers tels que la L-asparaginase, l'hydroxyurée, l'acide trans-rétinoïque, la suramine, l'irinotecan, le topotecan, la dexrazoxane, l'amifostine, l'herceptin ainsi que les hormones oestrogéniques, androgéniques.

20 30 - Association thérapeutique constituée d'un composé selon la revendication 1 et de radiations.

25 31 - Associations selon l'une quelconque des revendications 29 à 30 caractérisées en ce que chacun des composés ou des traitements est administré simultanément, séparément ou séquentiellement.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



2819255

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 598341
FR 0100205

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 93 20056 A (JARMAN MICHAEL ; COLEY HELEN MARY (GB)) 14 octobre 1993 (1993-10-14) * le document en entier *	1-31	C07D401/12 C07D401/14 C07D471/08 A61K31/53 A61P35/00
A	US 5 767 278 A (STRACKER ELAINE C ET AL) 16 juin 1998 (1998-06-16) * revendications *	1-31	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 08, 30 juin 1999 (1999-06-30) & JP 11 060573 A (NIPPON KAYAKU CO LTD), 2 mars 1999 (1999-03-02) * abrégé *	1-31	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7)
			C07D A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 juin 2001		Frelon, D	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P/4C14)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0100205 FA 598341**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 20-06-2001
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9320056 A	14-10-1993	AT 168105 T	15-07-1998
		AU 676677 B	20-03-1997
		AU 3894293 A	08-11-1993
		DE 69319590 D	13-08-1998
		DE 69319590 T	12-11-1998
		DK 632805 T	19-04-1999
		EP 0632805 A	11-01-1995
		ES 2118945 T	01-10-1998
		JP 7505380 T	15-06-1995
		US 5534625 A	09-07-1996
		US 5854244 A	29-12-1998
US 5767278 A	16-06-1998	AUCUN	
JP 11060573 A	02-03-1999	AUCUN	

EPO FORM P0485

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)